

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología



Estudio de la dinámica de desarrollo microbiano en la reacción de resazurina  
con jugo primario de caña

Trabajo de investigación presentado por José Napoleón Salcedo Zea para optar al  
grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2010



Estudio de la dinámica de desarrollo microbiano en la reacción de resazurina  
con jugo primario de caña

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología

Estudio de la dinámica de desarrollo microbiano en la reacción de resazurina  
con jugo primario de caña

Trabajo de investigación presentado por José Napoleón Salcedo Zea para optar al  
grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2010

## PREFACIO

Este trabajo de investigación constituye un primer acercamiento para conocer la dinámica de la reacción resazurina y jugo de caña. Este conocimiento es de utilidad para disminuir el tiempo de resultados en la prueba. De lograrse lo anterior significaría un ahorro en el gasto innecesario de desinfectantes en la industria azucarera o su correcta administración cuando lo amerite.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en paralelo al Megaproyecto de Caña de Azúcar 2009, y constituye el cuarto estudio consecutivo para el Departamento de Bioquímica y Microbiología sobre el tema.

En especial agradezco a mi directora de departamento, la Dra. Pamela Pennington, por el apoyo que me brindó durante toda mi carrera y para poder realizar este trabajo de investigación. A mi asesor, el Lic. Osbel Núñez, por estar siempre disponible para atender mis dudas. A mis amigos bioquímicos: Ana Lucía Ramírez, Bárbara de la Peña, Clara Ortega, Claudia Herrera, Jayne Clark, Karin Richter, María José Lou, Mariana Ramírez, Mónica Morales, Paola Balsells, Sofía Hernández, Tatiana Pinto, Wendy Jo, Francisco Valencia, Henry Canastuj, Juan Carlos Lol, Oscar de León, Pedro Pablo García, Sebastián Yurrita, y Thomas Peña, por hacer de esta travesía académica un viaje más agradable. A mis catedráticos: la Dra. Krisztina Ríos, Dra. María Eugenia Morales, Dra. Olga Chang, Dra. Patrizia Lupo, Inga. Yolanda Nieto, Inga. Jeannette Barrios, Lda. Beatríz López, Lda Margarita Palmieri, Lda. Maricruz Álvarez Muri, Lda. Lucía Nitsch, Lda. Odette Bocaletti y Lda. Sandra Estrada, B.S. Ricardo Ajiatáz, Dr. Adrián Gil, Dr. Carlos Fernández, Dr. Rubén Velasquez, Lic. José Carlos Chiquín y Lic. Marco Tulio Urizar, por ser un ejemplo de docencia a seguir en mi país. Entre todos mis catedráticos, deseo expresar mi gratitud a la Dra. Mónica Stein, por su enorme paciencia y su apasionado interés al enseñarnos biología molecular.

Este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo de la Lda. Ana Luisa Mendizabal, quien amablemente proporcionó el HPLC y las instalaciones de su laboratorio; a Nohemy Zelada, que depositó su confianza en mí para permitirme terminar mi trabajo a tiempo; y al Dr. José Héctor Aguilar, quien amablemente me abrió las puertas a esta hermosa profesión y hoy descansa en gloria eterna.

Dedico este trabajo de graduación a: mi Maestro Celestial, a mis padres Carlos e Irma, a mis hermanas Lourdes y en especial a Mayra, por apoyarme durante estos años de estudio; y lo hago como un reconocimiento de gratitud al finalizar mi carrera universitaria.

# ÍNDICE

	Página
PREFACIO.....	v
LISTADO DE CUADROS.....	viii
LISTADO DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	1
A. Antecedentes .....	1
1. La economía de la producción azucarera .....	1
2. Los microorganismos en la extracción del jugo de caña. ....	3
3. La reacción de resazurina. ....	5
B. Justificación .....	8
C. Objetivos .....	9
D. Hipótesis.....	9
II. MÉTODOS .....	10
A. Muestreo.....	10
B. Análisis microbiológicos.....	10
C. Análisis instrumental. Medición de dinámica de crecimiento con mediciones indirectas.....	12
D. Análisis estadístico.....	14
III. RESULTADOS .....	15
A. Reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo primario .....	15
B. Reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con microbiota aislada del jugo primario .....	17
C. Cuantificación de sacarosa en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo primario.....	19
IV. DISCUSIÓN .....	21
V. CONCLUSIONES.....	24
VI. RECOMENDACIONES .....	25
VII. LITERATURA CITADA .....	26
VIII. APÉNDICE .....	I
A. Procedimiento de toma de muestra .....	I
B. Preparación de soluciones y medios de trabajo.....	I
C. Cuadros .....	IV
D. Gráficas .....	IX

## LISTADO DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Producción, abastecimiento y distribución de azúcar centrifugada. ....	2
Cuadro 2. Composición general de la caña de azúcar. ....	3
Cuadro 3. Composición aproximada del jugo de caña. ....	4
Cuadro 4. Resumen estadístico de la reacción resazurina y jugo primario. ....	17
Cuadro 5. Resumen estadístico de la reacción resazurina y microbiota aislada de jugo. ....	19
Cuadro 6. Resumen estadístico de la reacción resazurina y jugo primario. ....	20
Cuadro 7. Medianas de tiempos de viraje a rojo y a punto final. ....	IV
Cuadro 8. Prueba MW-U en la comparación de tiempos de viraje de la reducción de resazurina con jugo primario y con microbiota aislada (McFarland 1.0).....	V
Cuadro 9. Prueba de correlación de rango de Spearman y prueba de correlación de rango significativa como análisis de asociación lineal entre variables.....	VII
Cuadro 10. Regresión logística de los tiempos de virajes en la reducción de resazurina con jugo primario y con microbiota aislada (McFarland 1.0). ....	VIII

## LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Variación de pH durante la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con jugo primario.....	16
Figura 2. Variación de pH durante la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con jugo primario.....	16
Figura 3. Dinámica de la microbiota durante la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con jugo primario..	16
Figura 4. Dinámica de la microbiota durante la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con jugo primario..	16
Figura 5. Variación de pH durante la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con jugo primario.....	18
Figura 6. Variación de pH durante la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con jugo primario.....	18
Figura 7. Variación de la densidad óptica en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con microbiota aislada de jugo primario. ....	18
Figura 8. Variación de densidad óptica en la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con microbiota aislada de jugo primario. ....	18
Figura 9. Variación de concentración de sacarosa en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con jugo primario. ....	18
Figura 10. Variación de concentración de sacarosa en la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con jugo primario. ....	18
Figura 11. Tiempos de virajes a rojo en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2. ....	16
Figura 12. Tiempos de viraje a punto final en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2. ....	16
Figura 13. Tiempos de virajes a rojo en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2. ....	21
Figura 14. Tiempos de viraje a punto final en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2. ....	21
Figura 15. Variación de pH durante la reducción de jugo con resazurina pH inicial 5.1. ....	IX
Figura 16. Variación de pH durante la reducción de jugo con resazurina pH inicial 6.2. ....	IX
Figura 17. Dinámica de la microbiota del jugo en la reducción con resazurina pH inicial 5.1. ....	IX
Figura 18. Dinámica de la microbiota del jugo en la reducción con resazurina pH inicial 6.2. ....	IX
Figura 19. Variación de pH durante la reducción de microbiota aislada con resazurina pH inicial 5.1. ....	X
Figura 20. Variación de pH durante la reducción de microbiota aislada con resazurina pH inicial 6.2. ....	X
Figura 21. Dinámica de la microbiota aislada del jugo en la reducción con resazurina pH inicial 5.1. ....	X
Figura 22. Dinámica de la microbiota aislada del jugo en la reducción con resazurina pH inicial 6.2. ....	X
Figura 23. Variación de concentración de sacarosa durante la reducción de jugo primario con resazurina pH inicial 5.1. ....	XI
Figura 24. Variación de concentración de sacarosa durante la reducción de jugo primario con resazurina pH inicial 6.2. ....	XI

## RESUMEN

Se estudió la dinámica de desarrollo de la microbiota en la reducción de resazurina. Para ello se utilizaron soluciones de resazurina pH inicial de 5.1 y 6.2. A la reducción de resazurina con jugo primario se les midieron cambios de pH y densidades microbiológicas. Se midieron cambios de pH y densidad óptica, a la reducción de resazurina con microbiota aislada de jugo, para observar cómo influía el cambio de pH inicial de resazurina en la dinámica de los virajes a rojo y a punto final. Se midió la variación de concentración de sacarosa en la reducción de resazurina con jugo para medir la dinámica de desarrollo de la microbiota con mediciones indirectas. Al evaluar los tiempos de viraje a rojo y a punto final con respecto a la densidad microbiológica total, condujo a considerar que no es el crecimiento microbiano durante la prueba, ni el pH inicial de la resazurina los determinantes, sino la densidad microbiológica inicial y su actividad metabólica. Se concluyó que modificar las condiciones de cultivo en la reacción resazurina y jugo no ocasionan mejoras. Se recomendó continuar con el estudio de la relación: viraje a rojo y densidad microbiológica inicial; para validar su uso como prueba presuntiva en condiciones fabriles.

# I. INTRODUCCIÓN

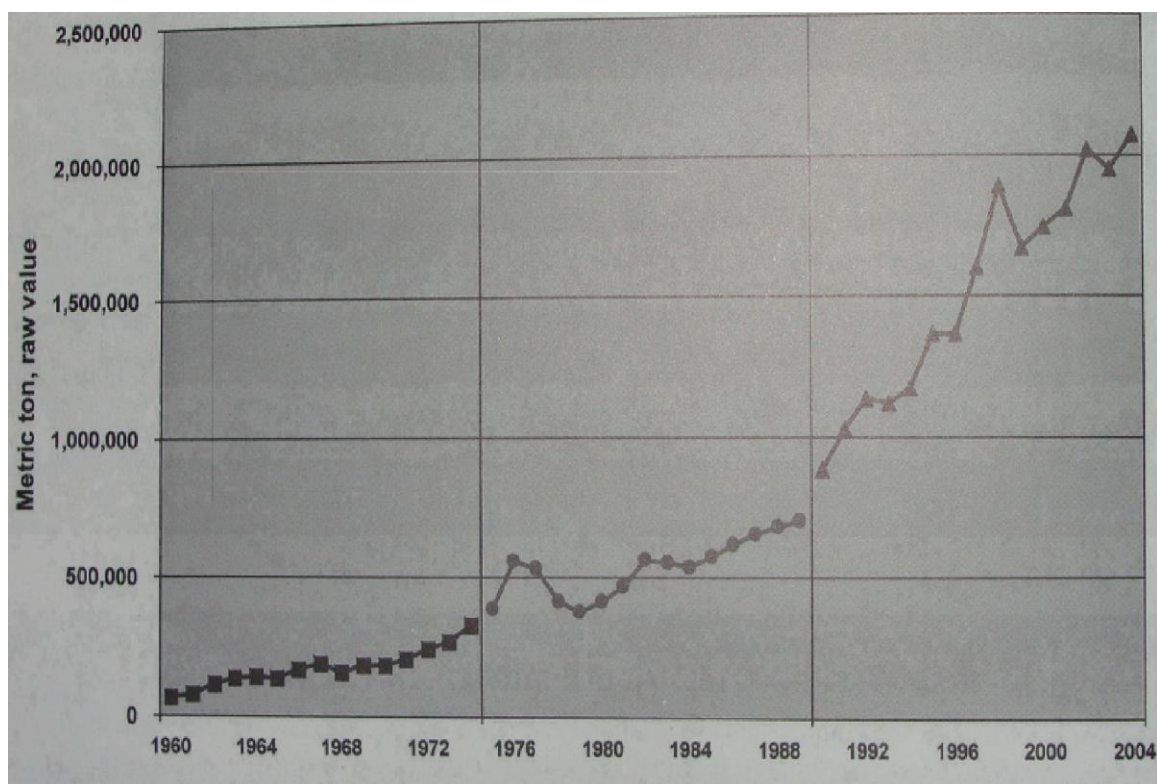
## A. Antecedentes

1. La economía de la producción azucarera. Desde la década de 1990 hasta el 2004 la industria del azúcar experimentó un descenso en los precios del azúcar. Llegando incluso a precios de venta por debajo del costo de producción. Sin embargo, desde el 2005 los precios del azúcar han empezado a subir. Las razones, aparte del aumento del precio del crudo, fueron que Brasil utilizaba más cultivos de caña para producir etanol, el aumento de consumo mundial y un descenso en las reservas de azúcar en el Mundo (Asadi, 2007).

La producción de azúcar de Guatemala se ha incrementado constantemente, llegando a duplicarse entre los años 1995 y el 2005. Se exporta más del 70% de la producción y se mantienen cerca de 170,000 hectáreas de cultivo de caña de azúcar. Junto con Sudáfrica y Colombia, Guatemala forma parte del grupo de productores-exportadores terciarios de azúcar centrifugada (F.A.S. USDA, 2005).

En la Figura 1 se observa la producción de azúcar en Guatemala, sin embargo, en un futuro cercano se espera un crecimiento más moderado. Las causas son: expansión rural, relocalización de Ingenios Azucareros y la necesidad de irrigación de la caña (McSweeney, 2005).

En el Cuadro 1 se muestra que para la zafra 2009-2010 se estima un crecimiento de exportación de azúcar en casi 100,000 toneladas métricas. Y que el total de la producción estimada para esta zafra será de 2,250 miles de toneladas métricas de azúcar. (E.R.S.USDA, 2009). De toda la producción de azúcar se estima que la pérdida ocasionada por microorganismos oscila entre un 0.5-5%, dependiendo de las condiciones climáticas y del tiempo que transcurre entre corte de caña y su ingreso a los molinos (Noack, 2008).

**Ilustración 1.** Producción de azúcar de Guatemala, 1960-2004.

(McSweeney, 2005)

**Cuadro 1.** Producción, abastecimiento y distribución de azúcar centrifugada.

	Stock inicial	Producción	Importación	Abastecimiento total	Exportaciones	Consumo doméstico	Stock final
<i>1,000 toneladas métricas, valor crudo</i>							
2007/08	410	2,274	0	2,684	1,333	742	609
2008/09	609	2,247	0	2,856	1,490	744	622
2009/10	622	2,250	0	2,872	1,515	745	612

(E.R.S. USDA, 2009)

Para hacer de la producción de azúcar de caña una industria rentable deben realizarse constantes innovaciones en toda su línea de producción. Para ello, la innovación y la aplicación de políticas de ahorro persiguen:

- Incrementar las ganancias por el uso de nuevas tecnologías, por ejemplo, el proceso de remoción de azúcar de la melaza.
- Uso de equipos de ahorro de energía.

- Aumento de la eficiencia de las fábricas y disminución del proceso de pérdida de azúcar.
- Aumentar la capacidad de las fábricas.
- Disminuir la mano de obra, entre otras (Asadi, 2007).

El crecimiento de la industria azucarera se contempla por el aumento de la demanda internacional del azúcar y de bioetanol (producido con la melaza), entre otras razones (Asadi, 2007). Para aumentar el rendimiento de la producción de azúcar es necesario disminuir la pérdida de sacarosa por acción de los microorganismos en la etapa de extracción del jugo (en los molinos).

2. Los microorganismos en la extracción del jugo de caña. El exudado de azúcar, del exterior de la caña de azúcar, provee un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos: las bacterias acidófilas ácido acéticas (acetobacterias). Se ha sugerido que las acetobacterias pueden ser la fuente de ácido 2-cetoglucónico detectado en jugo de caña de extracción reciente. Las acetobacterias son conocidas por ser transportadas por insectos, como las abejas que son una fuente importante de gluconobacterias. En general, las gluconobacterias prefieren los nichos ricos en azúcar, mientras que las acetobacterias predominan en ambientes que contienen etanol. Es muy probable que las levaduras acidofílicas y las acetobacterias sean las principales colonizadoras de la superficie de la caña en desarrollo (Ashbolt e Inkerman, 1990).

En estudios realizados de la microflora asociada con la caña de azúcar y sus jugos se ha encontrado que el grupo coliforme está presente en todas las fuentes analizadas. En muchos casos los coliformes eran el grupo predominante con Número Más Probable (NMP) de  $10^5$ - $10^8$  ml<sup>-1</sup> de jugo (Nunez y Colmer, 1968).

El contenido de azúcar presente en la caña varía de país en país, variando de 12-17% o un poco más. La proporción de fibra o materia leñosa es del 10 al 17%, correspondiendo al jugo 83-90%. En el Cuadro 2 se describe en general la composición de la caña de azúcar (Arqued, 1955).

**Cuadro 2.** Composición general de la caña de azúcar.

<i>Contenido</i>	<i>Porcentaje (%)</i>	<i>Descripción</i>
Agua	74.50	
Cenizas	0.50	Sílices (SiO <sub>2</sub> )..... 0.25 Potasio (K <sub>2</sub> O)..... 0.12 Sodio (Na <sub>2</sub> O)..... 0.01 Calcio (CaO)..... 0.02 Magnesio (MgO)..... 0.01 Hierro (F <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )..... Indicios Ácido fosfórico (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )..... 0.07 Ácido sulfúrico (SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> )..... 0.12 Cloro..... Indicios

Continuación Cuadro 2.

<i>Contenido</i>	<i>Porcentaje (%)</i>	<i>Descripción</i>
Fibra	10.00	Celulosa..... 5.50
		Pentosana (Xilana)..... 2.00
		Pentosana (Arabana) (Goma caña).. 0.50
		Lignina, entre otros..... 2.00
Azúcares	14.00	Sacarosa..... 12.50
		Dextrosa..... 0.90
		Levulosa ..... 0.60
Cuerpos nitrogenados	0.40	Albuminoides..... 0.12
		Aminoácidos (Asparagina)..... 0.07
		Aminoácidos..... 0.20
		Ácido nítrico..... 0.01
		Amoníaco..... Indicios
		Cuerpos xánticos..... Indicios
Grasas y cera	0.20	
Pectina (gomas)	0.20	
Ácidos libres	0.08	Ácido málico, ácido succínico, 0.08 entre otros
Ácidos combinados	0.12	
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	

(Arqued, 1955)

En el Cuadro 3 se presenta la composición aproximada del jugo de caña.

**Cuadro 3.** Composición aproximada del jugo de caña.

<i>Contenido</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Sacarosa	10.0 – 18.0
Agua	80.0 – 85.0
Azúcares reductores	0.3 - 3.0
No-azúcar inorgánico	0.2 - 0.6
No-azúcar orgánico	0.4 - 1.0

(Arqued, 1955)

El pH del jugo de caña se puede considerar constante, inmediatamente después de su extracción el pH varía de 4.97 a 5.30. Se ha reportado que en caña sana que no llega a madurar el pH es de 5.40. El pH del jugo desciende a medida que la caña madura. En cañas cortadas y abandonadas en el campo, quemadas o heladas, anormales por otras causas, el pH es más bajo (Arqued, 1955).

Se han tomado como indicadores de “frescura” de la caña: etanol, polisacáridos, azúcares reductores, dextranas o acidez total. Sens *et. Al* (2005) sugiere las mediciones de pH, a pesar de tener menor sensibilidad. Ensayos mostraron que el pH está estrechamente relacionado a demoras en proceso de corte de caña y extracción del jugo. Los valores de pH de 5.26 a 5.59 se obtuvieron para jugos de los

molinos con tres días de demora desde su corte. Cada 0.1 de descenso de pH indica una pérdida de 5% de masa de sacarosa en la cosecha. Convirtiendo a la medición de pH en el jugo de la caña como un indicador de caña deteriorada.

Sens *et. al.* (2005) sugiere no sólo a las mediciones de pH como indicadores de la frescura de la caña, sino también a mediciones de conductividad para saber la limpieza relativa de hojas y tapas, la turbidez directa para saber el contenido de suelo de la caña. Todos estos resultados sin realizar diluciones del jugo

La concentración óptima en azúcar, es de 6 a 10%, para la mayor parte de las bacterias, a concentraciones de 35-50% las bacterias cesan el desdoblamiento de las disoluciones azucaradas (Arqued, 1955). En jugos de caña, a concentraciones elevadas de sacarosa se observa una inhibición del crecimiento de la microflora del jugo de caña, pero no inhibe el crecimiento de *L. mesenteroides* (Lou, 2008).

De forma comparativa, en la fabricación del azúcar de remolacha el jugo de difusión constituye un medio adecuado para fermentaciones, la temperatura a la que se somete es favorable para los microorganismos que la producen. Especialmente cuando se trabaja a baja marcha. En estos jugos se han encontrado: *Leuconostoc* y otros cocos que forman mucílagos, *Bacillus* género *coli-bacilli*, *Bacillus* géneros *mesenteroides* y *subtilus*. De ellos, los más peligrosos mueren a temperaturas superiores a los 75° C. Su temperatura óptima es de 55-60° C. *Leuconostoc mesenteroides* es de los principales microorganismos que descomponen la sacarosa (Arqued, 1955).

3. La reacción de resazurina. La resazurina es un compuesto coloreado que cambia de color por actividad celular, de azul a rosado y de rosado a incoloro conforme es reducido, pero no precipita con la reducción. Esta reacción permite hacer una correlación directa entre la reducción de la resazurina en el medio de crecimiento y el rango de proliferación de organismos vivos. La resazurina detecta sistemas de oxidación enzimática que actúan como aceptores de electrones. La prueba de la resazurina se ha utilizado desde la década de 1950's para evaluar contaminación por bacterias o levaduras en fluidos biológicos; y más recientemente en: mediciones de la calidad del semen, viabilidad de córneas, funciones de la mitocondria, cuantificar proliferaciones de organismos vivos y diferentes tipos de células para su toxicidad (Rolón, Vega y Escario, 2006; Carter, Gaspar y Leise, 1955).

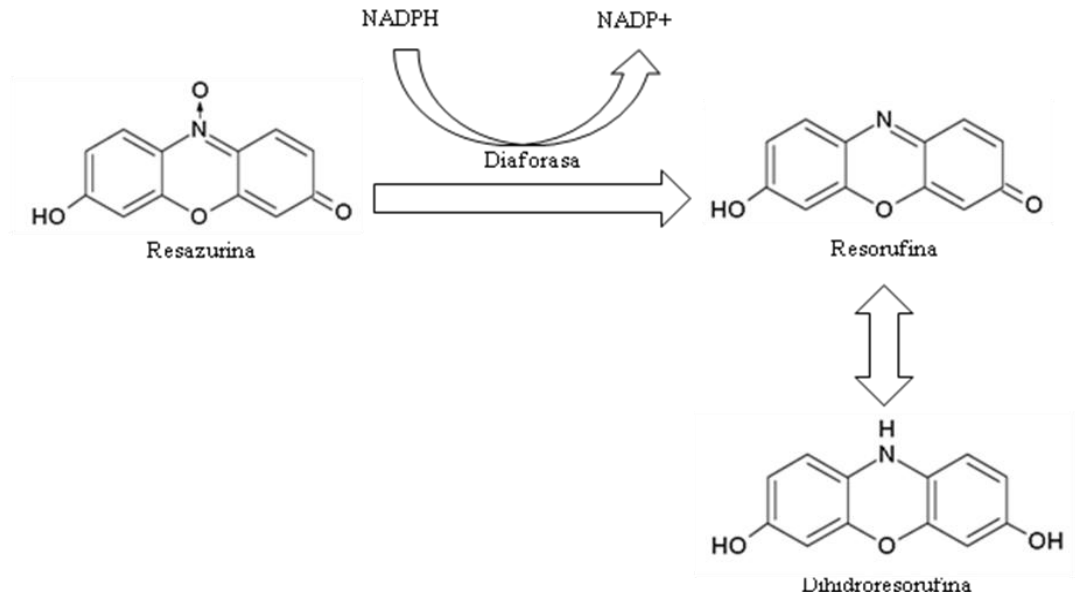
En la industria de la leche, estudios previos compararon la reducción de la resazurina, el azul de metileno y el recuento en placa, en el control del contenido bacteriano de leche. Observaron que los gérmenes que integran la flora microbiana presente en la leche desarrollaban escasa actividad metabólica en la prueba de la resazurina, operándose cambios REDOX en un mayor tiempo del que debieran de producirse (Liberio *et. al.*, 1958).

a. La reducción de la resazurina agrega el fundamento del cambio de color. La resazurina se reduce en la mitocondria en presencia de la diaforasa. Utiliza NADH o NADPH como reductor de resazurina a resorufina (Candeias *et. al.*, 1998). En la Ilustración 2 se muestra el mecanismo de reducción de la resazurina a dihidroresorufina. La reducción de resorufina a dihidroresorufina es reversible en presencia de oxígeno.

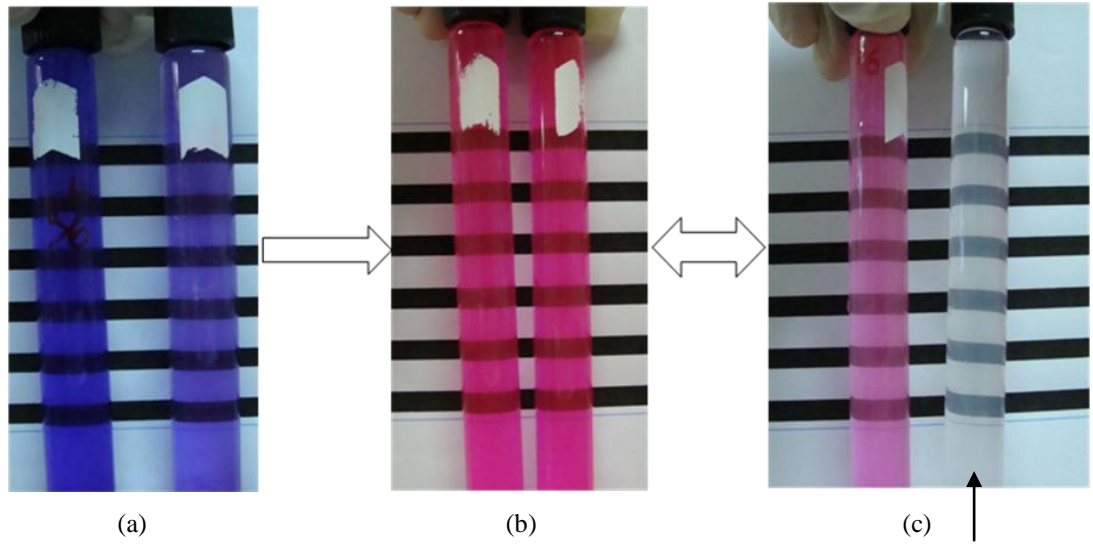
Con la resazurina las concentraciones de NAD(P)H pueden ser monitoreadas por fluorescencia directa. El colorante resazurina, que en estado puro es débilmente fluorescente, es catalizado por la diaforasa para ser reducido a su producto fuertemente fluorescente, la resorufina. La conversión más alta de resazurina a resorufina ocurre a pH 6.50 (Candeias *et. al.*, 1998).

La coloración de la reacción de reducción total de resazurina se muestra en la Ilustración 3. En la Ilustración 3.c se muestra que con sólo permitir el ingreso de oxígeno atmosférico al tubo de ensayo la reacción de reducción de resorufina a dihidroresorufina empieza a revertirse.

**Ilustración 2.** Reacción de reducción de la resazurina.



**Ilustración 3.** Reducción de resazurina con microbiota aislada de jugo de caña. (a) Coloración inicial de resazurina. (b) Resazurina reducida a resorufina. (c) Resorufina reducida a dihidroresorufina (incoloro).



## B. Justificación

A pesar de los resultados de estudios previos, el tiempo de respuesta de la reducción de resazurina es el principal factor que limita su uso como instrumento operativo de monitoreo-control para la actividad microbiana en el jugo primario de azúcar.

En trabajos recientes se ha estudiado la relación de inoculación entre el jugo y la solución de resazurina, además de estudiar diferentes contenedores y temperaturas (Sosa, 2008). Estas pruebas han partido de consideraciones *a priori* basadas en la lógica común o en el conocimiento de indicadores REDOX, la estructura de la resazurina y su transformación por las enzimas microbianas.

Sin embargo, no se conoce la dinámica de desarrollo microbiano durante la prueba, cuyo conocimiento permitiría encausar nuevos estudios o hipótesis, con un fundamento más racional y técnico. Para ello es necesario conocer con este estudio: la dinámica general del crecimiento de la microbiota total en la reacción que se lleva a cabo entre el jugo de caña y la solución de la resazurina dentro del tubo de ensayo; de qué forma influye en esa dinámica la densidad o actividad microbiana el estado fisiológico general de la microbiota presente en el jugo en el instante de inicio de la prueba; el tiempo mínimo en que la actividad microbiana en la muestra se manifiesta definitivamente en la prueba, permitiendo cortar la prueba y disminuir el tiempo de respuesta; la forma en que el pH inicial de la solución influye en la dinámica y en el tiempo total de respuesta.

La respuesta a lo anterior significará un importante avance para disminuir el tiempo de respuesta para la prueba de la resazurina y que esto permita aumentar su eficacia en el control de la actividad microbiana, para la optimización de los procesos de desinfección de los jugos de caña.

## C. Objetivos

### 1. General:

- a. Establecer un modelo de desarrollo de la población microbiana en la prueba de la resazurina.

### 2. Específicos:

- a. Establecer un modelo que correlacione la densidad microbiológica, medida por el recuento total estándar con el tiempo de análisis.
- b. Observar la influencia del pH de la solución original en la dinámica de desarrollo microbiano durante la prueba de la resazurina.
- c. Medición de la dinámica de crecimiento con mediciones indirectas (formación de productos o consumo de sustrato).

## D. Hipótesis

La hipótesis que se plantea es:

La determinación de la dinámica de desarrollo microbiana en diferentes condiciones puede sustentar la disminución del tiempo de respuesta en la prueba de la resazurina.

## II. MÉTODOS

### A. Muestreo

Las muestras de jugo primario fueron tomadas en el Ingenio Pantaleón, ubicado en el kilómetro 86.5 Carretera al Pacífico Siquinalá, departamento de Escuintla, Guatemala: el 1 de mayo del 2009, a finales de la zafra 2008-2009; y el 27 de noviembre del 2009, a principios de la zafra 2009-2010.

El 1 de mayo fueron tomadas 30 muestras de jugo primario del Tandem A y el 27 de noviembre seis muestras más (Ver inciso A del Apéndice). Las muestras se mantuvieron a  $-10^{\circ}$  C en el laboratorio de Operaciones Unitarias y en el laboratorio de Microbiología de la UVG hasta su uso.

### B. Análisis microbiológicos

#### 1. Análisis de cambios de pH y de recuento total de mesófilos aeróbios en la reducción de resazurina con jugo primario

a. Las soluciones de resazurina a diferentes pH's se prepararon como se describe en el Apéndice B.2.b.

b. En tubos con tapón de rosca se agregaban 2/3 del volumen con solución de resazurina. Los tubos se incubaban al menos 1 hora a  $37 \pm 2^{\circ}$  C.

c. La muestra de jugo primario se había quedado descongelando en el refrigerador desde la tarde/noche anterior.

d. Los tubos con resazurina se terminaban de aforar a ras de la rosca con el jugo de caña descongelado, procurando que rebalsara un poco para no dejar burbujas de aire al momento de cerrarlo con el tapón de rosca del tubo. Se agitaba por inversión, el tubo cerrado, una sola vez.

e. Se incubaban los tubos de ensayo a  $37 \pm 2^{\circ}$  C y se apuntaba la hora de inicio de incubación.

f. Cada 30 min, incluyendo el tiempo cero, se medía el pH del contenido de un tubo de ensayo, se realizaban siembras por vertido en las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  o  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  (Ver Apéndice B.1.c). Y se anotaban los cambios de color en la solución.

La decoloración de la mezcla provocada por la reducción de la resazurina va de morado a rojo en una reacción irreversible; y de rojo a incoloro en una reacción reversible por la presencia de oxígeno (Ver Ilustración 3).

g. Se realizaban estas mediciones hasta finalizar cuatro horas de reacción o hasta que la coloración del tubo fuese incolora (el viraje a punto final). El experimento se repitió cinco veces para cada pH de solución de resazurina: resazurina pH inicial 5.1 y pH inicial 6.2.

h. Finalizada la práctica se limpiaba toda la cristalería, se limpiaba con agua y se desinfectaba con etanol 70% el gabinete de flujo laminar y por último se dejaba 10-15 min con UV (Noack, 2008).

## 2. Análisis de cambios de pH y de absorbancia para microbiota aislada de jugo primario en la reducción de resazurina

### a. Identificación de longitud de onda de máxima absorbancia de resazurina

1) Utilizando el espectrofotómetro Hewlett Packard 8453E del Laboratorio de Instrumental Avanzado, Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, se analizó el espectro completo de solución de resazurina. Se analizó desde 200-1050 nm, obteniendo el máximo de absorbancia a los 602 nm/1.3711 Unidades de Absorbancia (AU).

2) Para eliminar la posibilidad de interferencia se midió el mismo espectro del agua de peptona. Obteniendo que a ~600 nm la absorbancia era mucho menor que 0.5 AU.

### b. Cultivo de microbiota de jugo primario

1) Dentro del gabinete de flujo laminar limpio y desinfectado con etanol 70% y UV, se agregaban 1000 µl de jugo primario a una caja Petri con PCA. Se dejaba secar la caja abierta al menos cinco minutos y se incubaba a  $32 \pm 2^\circ$  C por 48 h.

2) A ~250 ml de agua de peptona (preparación ver Apéndice A.1.b) se les llevaba a una turbidez de 1 McFarland con la microbiota cultivada en PCA.

a) Se ajustaba el espectrofotómetro Thermo BioMate a 625 nm.

b) Se medía el blanco que consistía en agua de peptona.

c) Dentro de la campana de flujo laminar limpia y desinfectada se aspiraba con una jeringa agua de peptona.

d) Se lavaba a presión el cultivo de la microbiota. A este líquido con microorganismos que estaba en la caja de Petri se regresaba al erlenmeyer que contenía los 250 ml de agua de peptona.

e) Se agitaba por unos segundos hasta que la solución fuera uniforme.

f) Y se medía en el espectrofotómetro. Para mediciones de espectrofotometría el control de calidad de McFarland estándar 1.0 dice que a 625 nm la absorbancia debe ser de 0.16-0.20 AU (Quelab, 2005).

g) Si la absorbancia no era la anterior se repetía desde el inciso d.

h) Después de ajustar la AU, esta se anotaba, se cerraba el erlenmeyer y se guardaba en el refrigerador hasta su uso (menos de 12 horas).

### c. Mediciones de pH y absorbancias en tiempos de reducción de resazurina para la solución 1 McFarland de la microbiota aislada del jugo primario

- 1) Las soluciones de resazurina a diferentes pH's se prepararon como se describe en el Apéndice B.2.b.
- 2) En tubos con tapón de rosca se agregaban 2/3 del volumen con solución de resazurina. Los tubos se incubaban al menos 1 hora a  $37\pm 2^\circ$  C.
- 3) En vez de jugo primario se utilizaba la solución de microbiota a 1 McFarland, preparada en el inciso anterior.
- 4) Los tubos con resazurina se terminaban de aforar a ras de la rosca con la solución de microbiota 1 McFarland, procurando que rebalsara un poco para no dejar burbujas de aire al momento de cerrarlo con el tapón de rosca del tubo. Se agitaba por inversión, el tubo cerrado, una sola vez.
- 5) Se incubaban los tubos de ensayo a  $37\pm 2^\circ$  C y se apuntaba la hora de inicio de incubación.
- 6) Cada 30 min, incluyendo el tiempo cero, se medía el pH del contenido de un tubo de ensayo, se medían las absorbancias a 602 nm en el espectrofotómetro Thermo BioMate. Y también se anotaban los cambios de color de la solución.
- 7) Se realizaban estas mediciones hasta finalizar cuatro horas de reacción o hasta que la coloración del tubo fuese incolora (el viraje a punto final). El experimento se repitió cinco veces para cada solución de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2.
- 8) Finalizada la práctica se limpiaba toda la cristalería.

## C. Análisis instrumental. Medición de dinámica de crecimiento con mediciones indirectas

### 1. Variación de concentración de sacarosa en la prueba de reducción de resazurina con jugo primario, medida con HPLC

#### a. Detención de la reducción de resazurina

1) Se realizó la reducción de resazurina en jugo primario como se describe en la sección IV.B.1.1) al inciso 5). Cada treinta minutos a un tubo con jugo y resazurina pH inicial 5.1 y a uno con jugo y resazurina pH inicial 6.2 se les anotaba el color y se detenía la reacción con formol comercial:

- a) Para detener la reacción se extraía 1 ml del contenido de cada tubo y se agregaba 1 ml de formol.
  - b) Se cerraba cada tubo y se agitaba por 30 s.
- 2) Después de detenida la reacción se guardaban los tubos en el refrigerador.

#### b. Filtrado y cuantificación de sacarosa de las muestras con reducción detenida

- 1) Se neutralizó el contenido de cada tubo a pH  $7.0 \pm 0.1$  con solución NaOH 0.01 N y un pH-metro.
- 2) Se numeraron las muestras y tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- 3) A cada tubo Eppendorf de 1.5 ml, correspondiente a su numeración, se le agregaban 1000  $\mu$ l del contenido con una micropipeta Eppendorf P1000 y una punta distinta.
- 4) Se centrifugaron los tubos de 1.5 ml a 10,000 g por 10 min a 4° C.
- 5) Se prepararon las soluciones estándares de sacarosa 0.5M, 0.25M y 0.125M como se describe en el Apéndice B.2.c.
- 6) En el laboratorio de Instrumental Avanzado, del Instituto de Investigaciones de la UVG, se realizó la medición de sacarosa por HPLC.
  - a) Una Jeringa limpia de vidrio B-D Multifit de 5 cc con una pinza Millipore se le colocó un filtro Millipore Bedford Tipo HA de 0.45  $\mu$ m.
  - b) Para eliminar el agua de la jeringa se enjuagaba la jeringa con el contenido de la solución a filtrar.
  - c) Se filtraba cerca de 0.5 ml de la solución a un vial limpio.
  - d) El vial con la solución tenía la misma numeración que el tubo de 1.5 ml.
  - e) Se descartaba el filtro, se lavaba con agua desmineralizada la jeringa con todo su sistema de filtrado.
  - f) Se repetía el mismo procedimiento para cada muestra.

c. Medición de la variación de la concentración de sacarosa, por HPLC, en la reducción de resazurina con jugo primario

- 1) El equipo utilizado fue un cromatógrafo HPLC Agilent Serie 1100 con un detector de índice de refracción (RID) y la columna Agilent NH2 Zorbax. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo:agua 70:30 filtrada con filtro Millipore de 0.45  $\mu$ m. La razón de flujo de 1.5 ml/min, la temperatura de análisis fue de 20° C y la presión de 101 bar. El método utilizado fue el “Método para azúcares y alcohol”. Los estándares de calibración fueron soluciones de sacarosa 0.5M, 0.25M y 0.125 M (Preparación en Apéndice B.2.c). Volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l. El tiempo de parada fue de 6 min.
- 2) Con una jeringa de 50  $\mu$ l de capacidad se inyectaban 30  $\mu$ l de la muestra al cromatógrafo (esta era la lavada del inyector). En seguida, siempre cuidando de que no quedara burbuja en la jeringa, se inyectaban otros 30  $\mu$ l de la muestra y se activaba el interruptor de inyección. Cada muestra corría por 6 min.
- 3) El programa integrador del HPLC del Software Chemstation for LC Rev A. 1002[1757] Agilent Technologies 1990-2003 calculaba el área del pico.
- 4) Con base a las áreas de los picos de las soluciones estándar de sacarosa se realizó la curva de calibración de sacarosa y se cuantificó el contenido de sacarosa de cada muestra.
- 5) Se trabajó en triplicado.

## D. Análisis estadístico

Los gráficos de cajas se realizaron utilizando el paquete estadístico MYSTAT 12, Versión No. 12.02.00. La prueba de Mann Whitney-U (MW-U) se realizó utilizando la siguiente página de Internet: <http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>. La prueba de regresión logística se realizó utilizando la siguiente página de Internet: <http://faculty.vassar.edu/lowry/logreg1.html>. Y los valores  $p$  se calcularon utilizando la página de Internet: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/pvalue1.cfm>.

1. Reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo primario. Se calcularon las medianas y se graficaron gráficos de cajas de: pH's de las mediciones particulares, recuentos totales de mesófilos aerobios y los tiempos de virajes a rojo y a punto final. Se calculó la prueba de Mann Whitney-U (MW-U) y regresión logística para comparar y describir la relación entre los tiempos de viraje a rojo y a punto final con el uso de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2. Y la prueba de correlación de rango de Spearman como medida de asociación lineal entre las variables: pH y recuento total.

2. Reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con microbiota aislada de jugo primario (McFarland 1.0). Se calcularon las medianas y se graficaron gráficos de cajas de: pH's de las mediciones particulares, densidad óptica y los tiempos de virajes a rojo y a punto final. Se calculó la prueba de MW-U y regresión logística para comparar y describir la relación entre los tiempos de viraje a rojo y a punto final con el uso de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2. La prueba de ANOVA de un factor, para comparar las medianas de la densidad óptica al utilizar resazurina pH inicial 5.1 y 6.2. Y la prueba de correlación de rango de Spearman como medida de asociación lineal entre las variables: pH y Densidad óptica.

3. Cuantificación de sacarosa en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo primario. Se calculó una curva de calibración con un análisis de regresión lineal, con un nivel de confianza del 95%, utilizando soluciones de sacarosa de distinta molaridad con respecto al tiempo de retención. Se calcularon las medianas y se graficaron gráficos de cajas de las concentración de sacarosa al utilizar resazurina pH inicial 5.1 y 6.2. Se realizó un análisis de regresión lineal para las medianas de las gráficas de cajas anteriores, con un nivel de confianza del 95%. Se calculó la prueba de MW-U para comparar la relación entre las concentraciones de sacarosa con el uso de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2. Y la prueba de correlación de rango de Spearman como medida de asociación lineal entre las variables: pH y concentración de sacarosa, y recuento total y concentración de sacarosa.

### III. RESULTADOS

#### A. Reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo primario

En la reducción de resazurina con jugo primario, tanto para el uso de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2, la tendencia del pH fue a disminuir (Figuras 1 y 2). En la reacción con resazurina pH inicial 5.1, las variaciones del pH tendieron a presentar un comportamiento sigmoidal hasta los 180 minutos (min); a partir de allí el pH presentó una tendencia a descender (Figura 1). La reacción con resazurina pH inicial 6.2 también parecía describir un comportamiento sigmoidal, con la excepción que durante los primeros 30 min de reacción el pH aumentó (Figura 2); contrario a lo sucedido con resazurina pH inicial 5.1.

En la reacción con resazurina pH inicial 5.1 la densidad de la microbiota presentó un descenso durante los primeros 60 min. En los siguientes 60 min la densidad aumentó hasta encontrar el máximo a los 120 minutos. La densidad de la microbiota descendió a los 150 min y a partir de ese tiempo aumentó progresivamente (Figura 3). En esta reacción, a los 60 y 150 min la mediana del pH fue de 5.20 unidades de pH (Figuras 1 y 3).

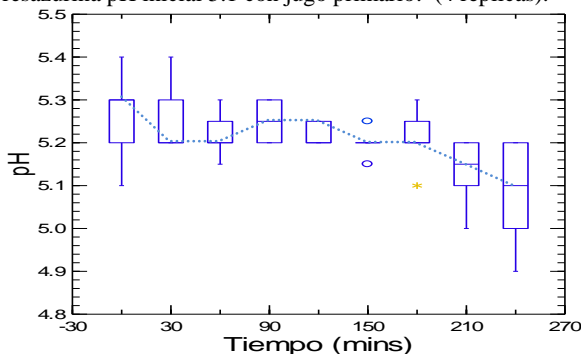
La densidad de la microbiota, en la reacción con resazurina pH inicial 6.2, presentó durante los primeros 60 min un comportamiento de descenso, semejante al obtenido con el uso de resazurina pH inicial 5.1. A partir de los 60 min mostró un ligero aumento en la densidad de la microbiota. Sin embargo, a los 120 min la densidad disminuyó nuevamente, similar al descenso ocurrido a los primeros 60 min. Este comportamiento se repitió de nuevo a los 120 min del inicio de la reacción. A partir de los 180 min del inicio, la densidad de la microbiota aumentó de forma progresiva (Figura 4).

Las medianas de los tiempos de viraje a rojo en la reacción, tanto al utilizar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2, resultaron ser las mismas. La dispersión de los resultados fue menor en la reacción con resazurina pH inicial 5.1 (Figura 5). Los tiempos de viraje a punto final no resultaron similares, al utilizar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2 (Figura 6). En la reducción de resazurina pH inicial 5.1: la mediana del tiempo de viraje a rojo coincide con la disminución en la densidad de la microbiota y con el inicio del descenso continuo del pH (Figuras 1, 3 y 5).

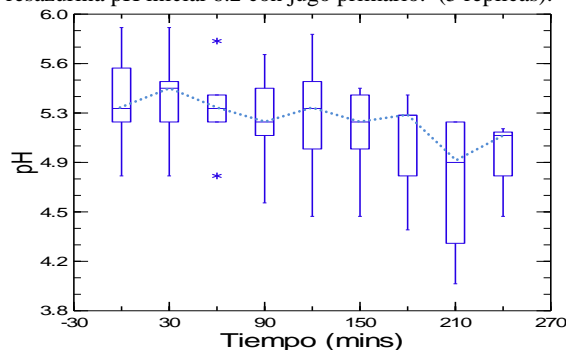
Las pruebas MW-U y regresión logística no indican la existencia de una diferencia significativa en los tiempos de viraje a rojo y a punto final, al utilizar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2 en la reacción. El coeficiente de correlación de Spearman indicó una correlación positiva y significativa, entre las variables pH y Recuento total de mesófilos aeróbios (Cuadro 4).

En los resultados de las reducciones individuales de resazurina pH inicial 6.2 con jugo primario, las muestras con mayor densidad microbiológica inicial: Corridas 6, 4 y 1; presentaron un viraje a rojo en menor tiempo comparado con las muestras con menor densidad microbiológica: Corridas 3 y 5. La anterior tendencia, de densidad microbiológica y viraje a rojo, no se observó en la reducción con resazurina pH inicial 5.1 (Figuras 17 y 18, Apéndice).

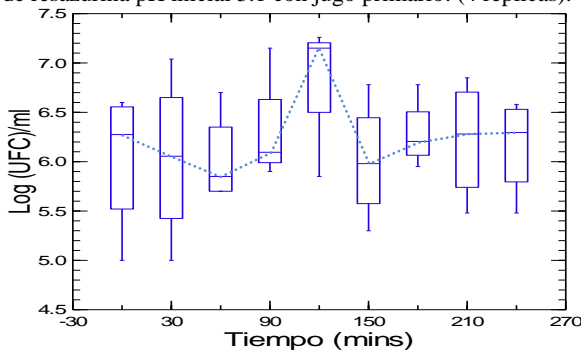
**Figura 1.** Variación de pH durante la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con jugo primario. (4 réplicas).



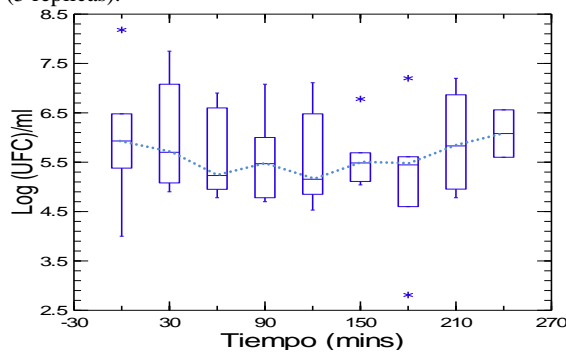
**Figura 2.** Variación de pH durante la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con jugo primario. (5 réplicas).



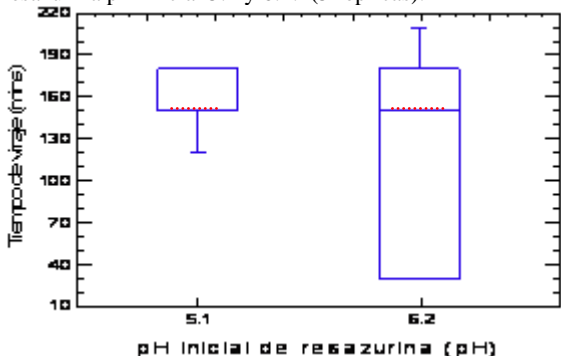
**Figura 3.** Dinámica de la microbiota durante la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con jugo primario. (4 réplicas).



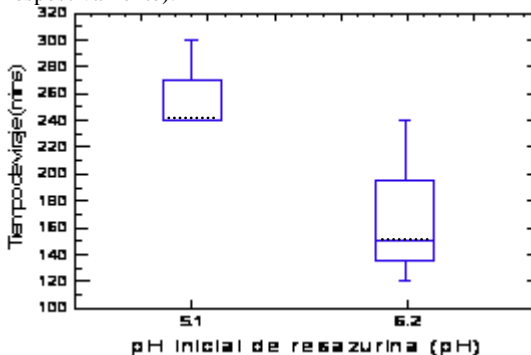
**Figura 4.** Dinámica de la microbiota durante la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con jugo primario. (5 réplicas).



**Figura 5.** Tiempos de virajes a rojo en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2. (5 réplicas).



**Figura 6.** Tiempos de viraje a punto final en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 (5 y 3 réplicas, respectivamente).



Leyenda de figuras: ● ó ●: Mediana \* ó \*: Valor atípico

**Cuadro 4.** Resumen estadístico de la reacción resazurina y jugo primario.

Comparación de tiempos de viraje de resazurina: pH inicial 5.1 y 6.2	Prueba MW-U Valor <i>U<sub>a</sub></i>	Regresión logística Valor <i>OR</i>	Interpretación
Viraje a rojo	11.0*	0.9978	Diferencia en los tiempos de viraje, al usar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2, resultó no significativa
Viraje a punto final	1.5*	0.9913	

\*Valor no significativo para la prueba MW-U, el valor  $p > \alpha: 0.05$ .

Variables	Resazurina pH inicial	Coefficiente de correlación de rango de Spearman ( $r_s$ )	Interpretación
pH y Recuento total	5.1	0.91**	Correlación positiva significativa entre variables
	6.2	0.97**	

\*\*Valor significativo para la prueba de Spearman, el valor  $p < \alpha: 0.05$ .

## B. Reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con microbiota aislada del jugo primario (McFarland 1.0)

La tendencia del comportamiento de pH's en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con microbiota aislada del jugo fue a mantenerse sin mayor variación. Durante los primeros 30 min el pH disminuyó, a los 60 min del inicio aumentó y se mantuvo hasta los 120 min. A los 150 min de reacción presentó el mínimo de pH. A los 180 min de reacción aumentó ligeramente y luego descendió progresivamente hasta los 240 min (Figura 7). La tendencia del comportamiento de pH's en la reducción con resazurina pH inicial 6.2 fue a disminuir durante toda la reacción. A los 150 min de reacción disminuyó el pH rápidamente, encontrando su mínimo. A partir de los 150 min el pH de la reacción aumentó ligeramente (Figura 8).

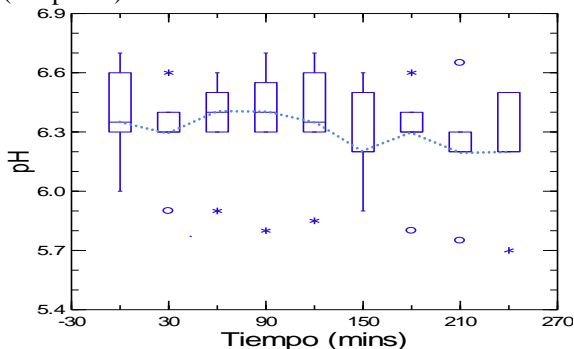
En general, las figuras semilog de la densidad óptica con respecto al tiempo, mostraron una disminución constante de las absorbancias. Esto ocurrió tanto para la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con microbiota aislada. La densidad óptica de las reducciones con resazurina pH inicial 5.1 mostró un mayor descenso a los 120 min de reacción. A partir de los 150 min el descenso en la densidad óptica fue menor (Figura 9). La densidad óptica de las reducciones de resazurina pH inicial 6.2 presentaron mayores descensos en la densidad óptica, en los minutos 120 al 180 (Figura 10). La ecuación de regresión lineal, incluida en las Figuras 9 y 10, sugiere que el descenso de la densidad óptica siguió en gran medida un modelo lineal.

Las medianas de los tiempos de viraje a rojo sugirieron que el viraje tiende a ocurrir antes al utilizar resazurina pH inicial 5.1 (Figura 11). El viraje a punto final no mostró esta tendencia (Figura 12).

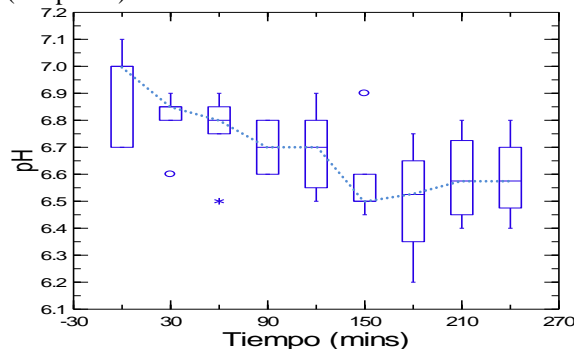
En la reacción con resazurina pH inicial 5.1 la mediana del tiempo de viraje a rojo coincidió con el inicio de disminución progresiva de pH y con la mayor disminución de la densidad óptica (Figuras 7, 9 y 11). Por otro lado, en la reacción con resazurina pH inicial 6.2 la mediana del viraje a rojo coincidió con un aumento progresivo del pH y con el mayor descenso de densidad óptica.

Las pruebas MW-U y regresión logística no indicaron la existencia de una diferencia significativa en los tiempos de viraje a rojo y a punto final, al utilizar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2. Los resultados del ANOVA indicaron que no existe diferencia significativa en la densidad óptica al utilizar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2, en la reacción con microbiota aislada. El coeficiente de correlación de Spearman indicó una correlación negativa y significativa, entre las variables pH y densidad óptica (Cuadro 5).

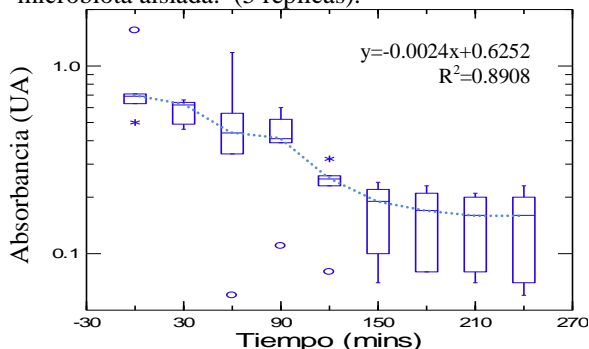
**Figura 7.** Variación de pH durante la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con microbiota aislada. (5 réplicas).



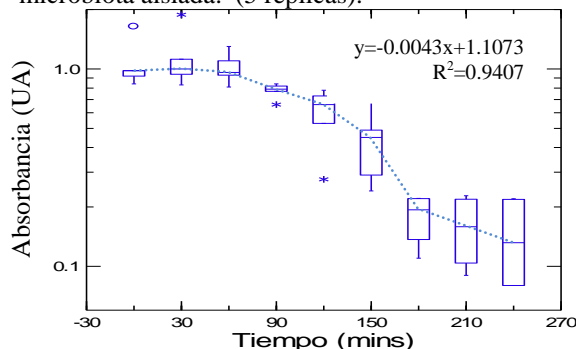
**Figura 8.** Variación de pH durante la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con microbiota aislada. (5 réplicas).



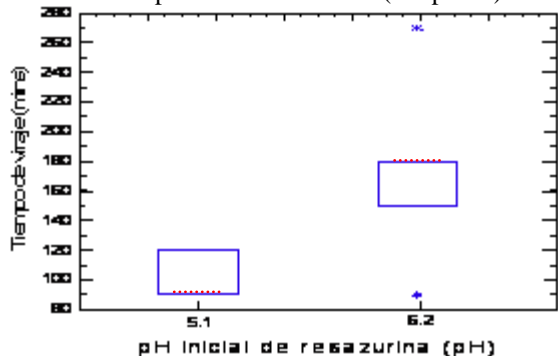
**Figura 9.** Variación de la densidad óptica en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con microbiota aislada. (5 réplicas).



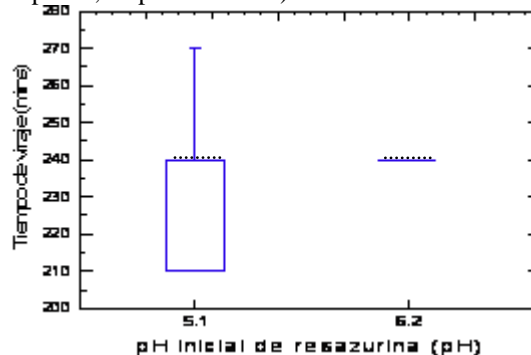
**Figura 10.** Variación de densidad óptica en la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con microbiota aislada. (5 réplicas).



**Figura 11.** Tiempos de virajes a rojo en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2. (5 réplicas).



**Figura 12.** Tiempos de viraje a punto final en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2 (5 y 3 réplicas, respectivamente).



Leyenda de figuras: --- ó ---: Mediana \* ó ○: Valor atípico

**Cuadro 5.** Resumen estadístico de la reacción resazurina y microbiota aislada de jugo.

Comparación de tiempos de viraje de resazurina: pH inicial 5.1 y 6.2	Prueba MW-U Valor <i>U<sub>a</sub></i>	Regresión logística Valor <i>OR</i>	Interpretación
Viraje a rojo	21.5*	1.0122	Diferencia en los tiempos de viraje, al usar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2, resultó no significativa
Viraje a punto final	9.0*	1.0373	

\*Valor no significativo para la prueba MW-U, el valor  $p > \alpha: 0.05$ .

ANOVA	Valor <i>p</i> ( $\alpha: 0.05$ )	Interpretación
Densidad óptica al utilizar resazurina: pH inicial 5.1 y 6.2	0.18**	Diferencia en densidad óptica, al usar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2, resultó no significativa

\*\*Valor no significativo para la prueba ANOVA, el valor  $p > \alpha: 0.05$ .

Variabes	Resazurina pH inicial	Coefficiente de correlación de rango de Spearman ( <i>r<sub>s</sub></i> )	Interpretación
pH y Densidad óptica	5.1	-1.91***	Correlación negativa significativa entre variables
	6.2	-1.79***	

\*\*\*Valor significativo para la prueba de Spearman, el valor  $p < \alpha: 0.05$ .

### C. Cuantificación de sacarosa en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo primario

Con base al análisis de regresión de áreas de picos (eje y) y concentraciones de soluciones de sacarosa (eje x) se obtuvo la siguiente ecuación para la cuantificación de sacarosa:

Ecuación 1. Cuantificación de sacarosa con HPLC.

$$\text{Área}_{\text{pico}} = m[M_{\text{sacarosa}}] + b \quad R^2 = 0.995$$

Donde:  $\text{Área}_{\text{pico}}$  = Área del pico que proporciona el cromatograma

$m$  = Pendiente = 3.129E7

$[M_{\text{sacarosa}}]$  = Valor de concentración de sacarosa que interesa

$b$  = intercepto = 1.163E6

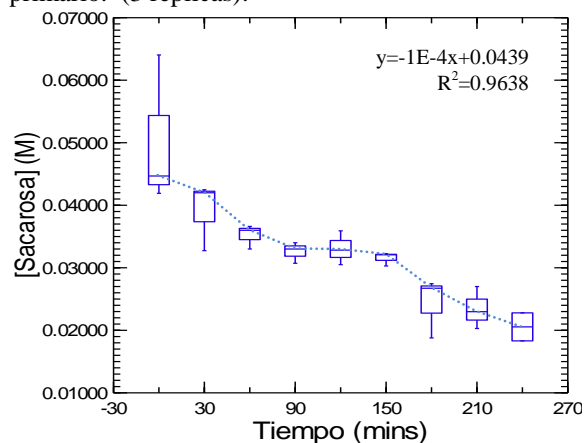
En la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo, las concentraciones de sacarosa disminuyeron (Figuras 13 y 14). El modelo de regresión lineal, incluido en las figuras, mostró que las medianas de concentración de sacarosa siguieron en gran medida un modelo de disminución lineal.

En la reacción con resazurina pH inicial 5.1 a partir de los 150 min el descenso en la concentración de sacarosa parecía ser similar al ocurrido durante los primeros 90 min de reacción (Figura 13).

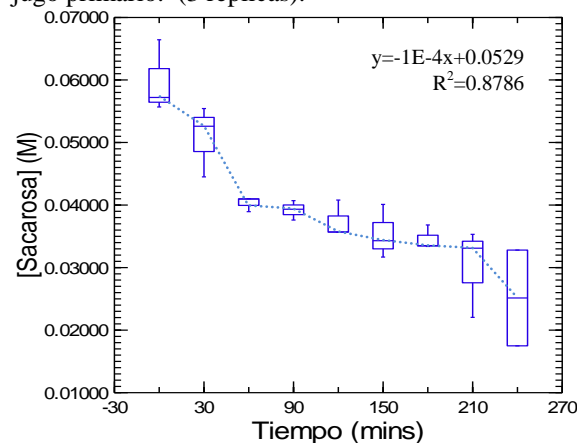
En la reacción con resazurina pH inicial 6.2 los primeros 60 min de reacción mostraron una alta disminución en la concentración de sacarosa. Luego permanecía estable y a los 210 min descendió nuevamente la concentración de sacarosa (Figura 14).

Con la prueba MW-U se comparó la concentración de sacarosa en cada tiempo, durante la reacción resazurina y jugo primario, y no se encontró significancia al utilizar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2. El coeficiente de correlación de Spearman indicó una correlación negativa y significativa entre las variables: pH y concentración de sacarosa y entre Recuento total y concentración de sacarosa (Cuadro 6).

**Figura 13.** Variación de concentración de sacarosa en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 con jugo primario. (3 réplicas).



**Figura 14.** Variación de concentración de sacarosa en la reducción de resazurina pH inicial 6.2 con jugo primario. (3 réplicas).



**Cuadro 6.** Resumen estadístico de la reacción resazurina y jugo primario.

Comparación de concentración de sacarosa al utilizar resazurina pH inicial 5.1 y 6.2	Prueba MW-U Valor $U_a$	Interpretación
Concentración de sacarosa	58.0*	Diferencia en concentración de sacarosa, al usar resazurina pH inicial 5.1 o 6.2, resultó ser no significativa

\*Valor no significativo para la prueba MW-U, el valor  $p > \alpha: 0.05$ .

Variabes	Resazurina pH inicial	Coficiente de correlación de rango de Spearman ( $r_s$ )	Interpretación
pH y Concentración de sacarosa	5.1	-1.01**	Correlación negativa significativa entre variables
	6.2	-1.02**	
Recuento total y Concentración de sacarosa	5.1	-1.90**	Correlación negativa significativa entre variables
	6.2	-1.31**	

\*\*Valor significativo para la prueba de Spearman, el valor  $p < \alpha: 0.05$ .

## IV. DISCUSIÓN

La prueba de reducción de resazurina se puede considerar como un método barato y de fácil aplicación para realizar una estimación indirecta de la concentración microbiana. En trabajos empíricos, paralelos a este estudio, estudiantes de Ingeniería Química investigan cómo mejorar el tiempo de respuesta. Conocer la dinámica de desarrollo de la microbiota dentro de la misma prueba puede sustentar de forma más coherente y segura la búsqueda de variantes para lograr optimizarla, sobre todo disminuir el tiempo de respuesta, mientras se mantiene su confiabilidad.

Este estudio constituye el primer acercamiento al tema. Para entender la dinámica de la microbiota de jugo primario en la prueba de la resazurina se midió el crecimiento microbiano total de mesófilos aeróbios, los cambios en el pH de la reacción resazurina y jugo; y los virajes a rojo y a punto final. Las mediciones anteriores se realizaron con resazurina pH inicial 5.1 y 6.2. El uso de resazurina pH inicial 5.1 se probó siguiendo el criterio preconcebido de que podría influir en el desarrollo de la prueba, en la dinámica de crecimiento de la microbiota. La medición de la reducción de resazurina por acción de la microbiota mesófila aerobia, aislada del jugo, se realizó con la densidad óptica para observar las tendencias de virajes a rojo y al punto final sin la interferencia de color del jugo. También se consideró como parte de la dinámica medir la disminución de sustrato, en este caso mediante la cuantificación de la concentración de sacarosa.

En la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2 con jugo, el descenso del pH está asociado al consumo de carbohidratos y a la formación de ácidos consecuente. Lo anterior, se corroboró por la disminución de la concentración de sacarosa obtenida en el transcurso de la cuantificación de la misma.

La dinámica de la microbiota en la reacción resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo, mostró que en el período de incubación utilizado, de hasta de cuatro horas, la microbiota no se comportó siguiendo la curva de crecimiento acostumbrada de microorganismos. En general, hubo un descenso inicial en la densidad de la microbiota. Esta fase resultó similar a la de latencia en la que la microbiota tenía que adaptar su mecanismo metabólico a las nuevas condiciones de pH, temperatura y salinidad de la resazurina. Y resultó más corta en la reacción con resazurina pH inicial 5.1, comparado con la de resazurina pH inicial 6.2. La dinámica de la microbiota del jugo, en la reacción con resazurina pH inicial 5.1, parecía mostrar una posible fase de crecimiento exponencial seguida de una posible fase de muerte rápida. En la reacción con resazurina pH inicial 6.2 la dinámica de la microbiota no presentó esta tendencia. Sin embargo, en ambos casos, después del tiempo de viraje a rojo ocurrió un aumento en la densidad de la microbiota, a medida que descendía el pH. Esta pudo ser la expresión de una nueva microbiota acidófila. Lo anterior, sustentado también, por el continuo descenso de sacarosa observado en la cuantificación de la misma.

El hecho de que la expresión de la microbiota del jugo aumentó cuando el pH era cercano a 5.20, sin importar si la reacción era con resazurina pH inicial 5.1 o 6.2, sugiere al pH 5.2 como posible indicador de alta expresión de la microbiota inicial del jugo, durante la reacción con resazurina.

Según la prueba MW-U y la regresión logística, el uso de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2 con jugo no mostró una diferencia significativa en los tiempos de viraje a rojo y a punto final. El coeficiente de correlación de Spearman indicó que, en general en la reacción resazurina con jugo, el descenso del pH se correlacionaba positivamente con el descenso de la densidad de la microbiota del jugo. También sugirió que existió menor cantidad de sacarosa en la reacción cuando la densidad de la microbiota era mayor; y que la microbiota presente a mayores pH's medidos consumió más sacarosa.

En el descenso lineal de la densidad óptica, obtenido durante la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con microbiota aislada del jugo, se observó que después del viraje a rojo la disminución de la densidad óptica fue mayor. Esto pudo corresponder al cambio de coloración de la resazurina o a un cambio de expresión a una microbiota acidófila; debido a que el pH posterior del viraje a rojo fue menor que el anterior al viraje. Esta disminución en la densidad óptica de la microbiota fue más manifiesta en la reacción con resazurina pH inicial 5.1 que con la resazurina pH inicial 6.2.

En la reducción de resazurina con microbiota aislada del jugo, las medianas de los tiempos de viraje a rojo fueron menores con el uso de resazurina pH inicial 5.1, comparado con el uso de resazurina pH inicial 6.2. Sin embargo, según la prueba MW-U y la regresión logística esta diferencia de tiempos de viraje no fue significativa. La ANOVA que comparó las densidades ópticas, al usar resazurina pH inicial 5.1 y 6.2, no encontró diferencia significativa entre las densidades ópticas. Según la prueba de Spearman, la correlación obtenida entre pH y densidad óptica fue la contraria a la obtenida entre pH y densidad microbiológica (en la reacción resazurina con jugo).

Los resultados de usar jugo o microbiota aislada del jugo en la reducción de resazurina difirieron, posiblemente, porque el jugo es un sistema más complejo. Por lo que al parecer el uso de microbiota aislada no es buen modelo para reducir resazurina. Por otra parte, dado el número de muestras aquí utilizadas y las condiciones del experimento, no se debería considerar el tema agotado y se sugeriría, ahora que se avanzó en los procedimientos de trabajo, realizar un estudio más profundo.

En la dinámica de la microbiota, de las corridas particulares de resazurina pH inicial 6.2 y jugo, la correspondencia del viraje a rojo con los diferentes valores de densidad microbiológica, sin que haya una multiplicación asociada, sustentan la medición del viraje a rojo como prueba presuntiva asociada a la densidad inicial y actividad de la microbiota presente; independiente del estadio de crecimiento de la población microbiana. Este resultado es prometedor en la confirmación de la hipótesis planteada de

sustentar, mediante la dinámica estudiada, la optimización de la prueba de resazurina en el sentido de disminuir su tiempo de respuesta. Que es el principal objetivo para su aplicación operativa en la industria.

Combinando los resultados obtenidos de las variaciones de pH's, densidades microbiológicas y tiempos de virajes durante la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y pH 6.2 con jugo, conducen a considerar que no es el crecimiento microbiano durante la prueba, ni el pH inicial, los determinantes; mientras que sí parecen serlo la densidad microbiológica inicial y la actividad metabólica que la misma desarrolla. Se puede concluir preliminarmente que el resultado de la prueba está dado por la densidad y actividad microbiológica en el momento inicial de la prueba y no por el desarrollo microbiológico dentro del propio tubo de la prueba experimental. Por lo que modificar las condiciones de cultivo en él, no parece ocasionar mejoras, como aquí se ha probado.

El hecho de que el glicerol puede ingresar a las células por acuagliceroporinas, en un transporte libre del uso de energía (Klaus, Lin y Wilson, 1980; Agre, 2003), lo hace candidato a ser usado como fuente de carbonos para aumentar el metabolismo de la microbiota inicial del jugo. De esta forma, la microbiota inicial reduciría antes la resazurina, porque presentaría un aumento en la respiración celular.

Con base a lo anterior y contrario a lo esperado, comenzar la reacción de resazurina pH inicial 5.1 con jugo parece no aminorar el tiempo de viraje a rojo, por lo que por el momento debe descartarse esa opción.

Como ya se ha indicado en párrafos anteriores, este tipo de trabajo combina hacer pruebas puntuales de recuentos microbiológicos en matrices donde hay incertidumbre del resultado. Lo que obliga a multiplicar las diluciones y mediciones de parámetros físicoquímicos asociados a la actividad microbiana, requieren mucha sincronización, sobre todo en casos como estos en que ha de hacerse sobre una prueba cuyo objeto de estudio está en el tiempo limitado de los primeros 45 minutos de ensayo. Cada corrida requirió un tiempo de preparación considerable, impidiendo una abundancia de repeticiones para obtener conclusiones más definitivas.

No obstante, con estos resultados preliminares se han precisado los procedimientos y la orientación para ampliar el estudio posterior.

## V. CONCLUSIONES

1. El cambio de pH inicial de la solución de resazurina no disminuyó significativamente el tiempo de respuesta de la prueba, por lo que al parecer la adaptación de la microbiota al medio de resazurina no afecta los tiempos de viraje.
2. En las condiciones del experimento, el cambio de pH no parece afectar el desarrollo de la microbiota durante la reacción. Pero otros cambios pueden ayudar.
3. Se cumplió con el objetivo principal, de establecer un modelo de desarrollo de la población microbiana en la prueba de la resazurina.
4. Aunque de forma preliminar, se evidenció la importancia de conocer la dinámica de desarrollo microbiano en el sustento de disminuir el tiempo de respuesta de la prueba de resazurina.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Estudiar la actividad metabólica y enzimática inicial de la microbiota durante la reducción de resazurina con jugo primario, para entender la dinámica de la microbiota en la reacción.
  
2. Los tiempos de viraje a rojo mostraron mayor dependencia de la densidad microbiológica inicial en el jugo, y su posible actividad, que del incremento de la misma dentro de la reacción resazurina-jugo. Por lo que se recomienda:
  - a. Continuar con el estudio del viraje a rojo en relación con la densidad microbiológica inicial para validar su utilización como prueba presuntiva de uso en condiciones fabriles.
  
  - b. Repetir la prueba con diferente densidad inicial de microbiota del jugo. Por ejemplo aumentando la concentración inicial del jugo.
  
  - c. Utilizar el glicerol como sustrato adicional en la reacción, para aumentar el metabolismo de la microbiota inicial del jugo y que esta reduzca más rápidamente la resazurina.

## VII. LITERATURA CITADA

- Agre, P.; y D. Kozono. 2003. *Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases*. FEBS Letters. 555: 72-78.
- Alves, E. R.; P. R. Fortes, E. P. Borges, y E. A. Zagatto. 2006. *Spectrophotometric flow-injection determination of total reducing sugars exploiting their alkaline degradation*. Centro para Energía Nuclear en Agricultura, Universidad de Sao Paulo, Brasil. *Analytica Chimica Acta*. 564: 231-235.
- Ashbolt, N.; y P. Inkerman. 1990. *Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug, Saccharococcus sacchari, and its environs*. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (3): 707-712.
- Candeias, L. P.; D. P. MacFarlane, S. L. McWhinnie, N. L. Maidwell, C. A. Roeschlaub, P. G. Sammes, y R. Whittlesey. 1998. *The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin*. *J. Chem Soc., Perkin Trans. 2*: 2333-2334.
- Carter, C. H.; A. J. Gaspar, y J. M. Leise. 1955. *Resazurin staining of bacterial colonies on membrane filters*. Fort Detrick, Frederick, Maryland, EEUU. *Journal of Bacteriology*. (71): 623.
- Clarkson Laboratory & Supply Inc. 2003. *Clarkson Laboratory & Supply Inc*. 350 Trousdale Drive Chula Vista, California, EEUU. Consultado el 30 de agosto del 2009 desde: <http://www.clarksonlab.com/pl.pdf>
- E.R.S. USDA. 2009. *Sugar and sweeteners yearbook tables: Table 1-World production, supply, and distribution, centrifugal sugar*. Economic Research Service. United States Department of Agriculture. EEUU. Consultado el 21 de julio desde: <http://www.ers.usda.gov/Briefing/Sugar/data/Table01.xls>
- F.A.S. USDA. 2005. *World sugar situation – December 2005*. Foreign Agricultural Service. United States Department of Agriculture. EEUU. Consultado el 28 de julio desde: [www.fas.usda.gov/.../sugar/.../World%20Sugar%20Situation%20.pdf](http://www.fas.usda.gov/.../sugar/.../World%20Sugar%20Situation%20.pdf)
- Forbes, A. A.; D. F. Sahm, y A. S. Weissfeld. 2007. *Diagnostic microbiology. Bailey & Scott's*. 12ª edición. Mosby Elsevier. China.

- Keusch, P. 2003. *Fehling's prueba*. Química Orgánica, Fac. de Química y Farmacia, Universidad de Regensburg, Alemania. Consultada el 12 de julio del 2009 desde: [http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische\\_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Fehling-e.htm](http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Fehling-e.htm)
- Klaus, B.; E. Lin, y T. Wilson. 1980. *Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 144 (1): 274-278.
- Libero, R.; L. Echenique, y N. Sosa. 1958. *Resazurina, azul de metileno y contaje en placa en el control del contenido bacteriano de la leche higiénica*. Instituto de Industria Animal. Uruguay. 8:243-258. Consultada el 9 de julio del 2009 desde: [http://www.fvet.edu.uy/fvbiblio/anales/1958\\_8\\_6\\_p243-258.pdf](http://www.fvet.edu.uy/fvbiblio/anales/1958_8_6_p243-258.pdf)
- Lou, M. J. 2008. *Desarrollo de un medio de cultivo costo-efectivo para el recuento y propagación de Leuconostoc mesenteroides en distintos jugos de caña*. Tesis de Licenciatura en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 106 pp.
- Lowry, R. 2010. *Simple logistic regression*. Herramienta de análisis estadístico en línea de Vassar College. Nueva York, EEUU. Consultada el 25 de mayo del 2010 desde: <http://faculty.vassar.edu/lowry/logreg1.html>
- McSweeney, J. F. 2005. *Guatemala: from zero to major exporter 1960-2004*. La Unión Sugar Group, Guatemala. *Proc. ISSCT*. 25: 465-470.
- Merck. 1994. *Microbiology manual 2000*. Merck KGaA, Darmstadt. Berlín, Alemania.
- Noack, M. A. 2008. *Estimación de la actividad microbiológica en diferentes jugos de caña por reducción de resazurina*. Tesis de Licenciatura en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 52 pp.
- Nunez, W. J.; y A. R. Colmer. 1968. *Differentiation of Aerobacter-Klebsiella isolated from sugarcane*. *Applied Microbiology*. 16 (12): 1875-1878.
- Quelab. 2005. *Mc Farland Standards*. Les Laboratoires QUELAB Laboratories Inc. Montreal, Canadá. Consultado el 3 de octubre del 2009 desde: <http://www.quelab.com/htmleng/2900a.html>
- Rolón, M.; C. Vega, y J. A. Escario. 2006. *Development of resaruzin microtiter assay for drug sensibility pruebaing of Trypanosoma cruzi epimastigotes*. *Springer-Verlag. Parasitol Res.* 99: 103-107.

- Sens, V.; L. Corcodel, y A. Leveau. 2005. *Monitoring cane quality with quick and cheap analytical indicators on cane sugar*. Service Process Sucrier. CERF-Réunion. Proc. ISSCT. 25:164-169.
- Sosa, G. A. J. 2008. *Desarrollo del kit para la prueba de resazurina en la industria azucarera*. Tesis de Ingeniería Química, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 88 pp.
- Toté, K.; D. V. Berghe, S. Levecque, E. Bénéré, L. Maes, y P. Cos. 2009. *Evaluation of hydrogen peroxide-based disinfectants in a new resazurin microplate method for rapid efficacy pruebaing of biocides*. Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene, University of Antwerp, Antwerp, Bélgica. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 606-615.

## VIII. APÉNDICE

### A. Procedimiento de toma de muestra

#### 1. Muestreo

a. Previo al ingreso al Ingenio Pantaleón se contó con la autorización del señor Eddy Serrano (Encargado de laboratorio). Para ingresar a la planta durante el muestreo, el Ingenio prestó casco de seguridad industrial y protección auricular. Así mismo envió un operario de la planta para ayudarme en el transporte de la hielera en el Ingenio.

b. Las muestras se tomaron del primero molino del Tandem con ayuda de un recipiente de metal que tenía soldada una vara de metal.

c. Las muestras se almacenaron en frascos limpios de plástico de 250 ml de capacidad. Cada recipiente fue enjuagado con jugo y posteriormente llenado.

d. Después de llenado se almacenaron temporalmente las muestras en una hielera con hielo para ser transportado hasta la Ciudad de Guatemala.

### B. Preparación de soluciones y medios de trabajo

#### 1. Preparación de medios de cultivo

##### a. Plate Count Agar (PCA)

1) Se pesó en papel parafinado 22.5 g de medio PCA Merck por cada litro a preparar.

2) Se transfirió el medio pesado a un erlenmeyer limpio y se adicionó el volumen de agua necesario, se calentó a ebullición con agitación constante.

3) Se transfirió la mitad del volumen a otro erlenmeyer de igual volumen, de forma que quedaba la mitad o tres cuartos del erlenmeyer lleno, se colocó el tapón de gasa y algodón y cinta testigo.

4) Se autoclaveó por 15 min a 121° C y 15 psi (Merck, 1994).

5) Antes de abrir la autoclave se esperó que la presión fuese cero PSI y la temperatura de 45±5° C.

6) El medio permanecía a 70±5° C hasta su uso. Para verterlo en cajas se enfriaba a 45±5° C (Noack, 2008)

### b. Agua peptona

- 1) Se pesaban en papel parafinado 2.55 g de agua de peptona Merck por cada litro a preparar.
- 2) Se agregaba el contenido pesado en un erlenmeyer limpio y se agregaba el volumen medido en una probeta limpia. Se calentaba a ebullición con agitación constante para disolverlo.
- 3) Se transfería el volumen total a dos erlenmeyers, de forma que quedaban llenos hasta no más de 2/3 de su capacidad total. Se pegaba cinta testigo.
- 4) Se autoclaveaba 15 min a 121° C y 15 psi (Merck, 1994).
- 5) Antes de abrir la autoclave se esperaba que la presión fuese cero psi y la temperatura de  $45\pm 5^\circ$  C.
- 6) El agua de peptona se almacenaba en refrigeración hasta su uso.

### c. Siembras por vertido

- 1) Se limpiaba el gabinete de flujo laminar de bioseguridad II con agua y se desinfectaba con etanol 70%. Se desinfectaba con luz UV de 10-15 min.
- 2) Dentro del gabinete se rotulaban las cajas Petri con el número de dilución y el tiempo de incubación: desde el tiempo cero cada 30 min hasta llegar a los 240 minutos esperados de reducción de la resazurina en jugo de caña. En algunas muestras se incubó hasta los 300 min.
- 3) Con una micropipeta Eppendorf P1000 y una punta autoclaveada se tomaban 1000  $\mu$ l de la mezcla resazurina-jugo primario y se agregaban a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua de peptona. Esta era la dilución 1:10 de la mezcla resazurina-jugo primario.
- 4) Se realizaban las diluciones seriadas hasta obtener la dilución  $1:10^{-7}$ . Cambiando de puntas entre cada dilución. Dependiendo de la muestra de jugo a veces sólo se llegaba a la dilución  $1:10^{-6}$ .
- 5) De las diluciones  $1:10^{-5}$  y  $1:10^{-6}$ , o  $1:10^{-6}$  y  $1:10^{-7}$  se agregaban 1000  $\mu$ l de inóculo al centro de la caja Petri rotulada que correspondía.
- 6) Se añadía el medio Plate Count a  $40\pm 5^\circ$  C sobre el inóculo hasta cubrir la caja, para que este se esparciese por toda la caja. Se agitaba la caja haciendo movimientos circulares hasta completar ocho ciclos completos.
- 7) Se tapaba la caja.
- 8) Se verificaba que el medio ya hubiese solidificado.
- 9) Se incubaban las cajas invertidas por 48 h a  $32\pm 2^\circ$  C.

10) Para el recuento: se contaba el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cada caja. Se contaban las cajas con 25-300 colonias. Este número de UFC se multiplicaba por el factor de dilución. Y se reportaba el resultado como UFC/ml (Noack, 2008).

11) Análisis del recuento: al resultado del recuento se le calculó el logaritmo base 10. De forma que en los gráficos aparece como  $[\log(\text{UFC})]/\text{ml}$ .

## 2. Preparación de soluciones

### a. Solución de ácido fosfórico 0.01 N (50 ml)

1) En un beaker de 10 ml se agregaron aproximadamente 5 ml de agua desmineralizada.

2) Se midieron en una pipeta de 1 ml de capacidad 0.1 ml de ácido fosfórico y se agregó el contenido al beaker.

3) Se agitó con una varilla de vidrio y se trasladó el contenido a un balón volumétrico de 50 ml de capacidad. Se aforaró a 50 ml con agua desmineralizada.

4) El ácido se almacenó en un frasco debidamente rotulado.

### b. Preparación de soluciones de resazurina

1) Se pesaba en papel parafinado 9.0 g de NaCl y 0.01g de reactivo de Resazurina Aldrich 92%.

2) Se disolvían ambos reactivos en un beaker o erlenmeyer de 100 ml con agua desmineralizada.

3) Se trasladaban a un balón volumétrico de 1000 ml de capacidad y se aforaban con agua desmineralizada.

4) Se esterilizaba en baño de maría a  $\sim 100^\circ \text{C}$  durante una hora.

5) Seguido de la esterilización se cambiaba el pH de la solución a 5 con gotas de ácido fosfórico 0.01 N (Ver inciso B.2.a) agitación constante y un pH-metro; o se dejaba con su pH de  $\sim 6$ .

6) La solución se mantenía almacenada hasta un mes a  $4^\circ \text{C}$  y protegida de la luz (Toté *et. Al.*, 2009; Noack, 2008). Después de este tiempo se desechaba y se preparaba una solución nueva.

### c. Preparación de soluciones de sacarosa para la curva de calibración de sacarosa

1) Para el estándar 0.5M: se pesaron 8.5515 g de sacarosa Merck KGaA en un papel parafinado.

- 2) En un beaker de 50 ml se disolvieron con ~25 ml de agua desmineralizada.
- 3) Se aforó en un balón volumétrico de 50 ml con agua desmineralizada.
- 4) Se realizó el mismo procedimiento para la solución de 0.25 M y 0.125 M.
- 5) Se guardaron las soluciones debidamente rotuladas hasta su análisis.

d. Preparación de solución de hidróxido de sodio 0.01 N

- 1) Se pesaron 0.0333 g de hidróxido de sodio en un papel parafinado.
- 2) En un beaker de 50 ml, con 25 ml de agua desmineralizada, se disolvieron las perlas de NaOH.
- 3) Se aforó en un balón volumétrico de 50 ml con agua desmineralizada.
- 4) Se guardó la solución debidamente rotulada.

### C. Cuadros

**Cuadro 7.** Medianas de tiempos de viraje a rojo y a punto final.

<i>a. Reacción de jugo primario y resazurina</i>				
	Viraje a rojo, resazurina pH inicial		Viraje a punto final, resazurina pH inicial	
	pH 5.1	pH 6.2	pH 5.1	pH 6.2
Tiempos de viraje (minutos)	180	30	240	120
	120	150	300	240
	150	180	240	150
	180	210	270	
	150	30	240	
<b>Mediana</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>240</b>	<b>150</b>

<i>b. Reacción de microbiota aislada del jugo y resazurina</i>				
	Viraje a rojo, resazurina pH inicial		Viraje a punto final, resazurina pH inicial	
	pH 5.1	pH 6.2	pH 5.1	pH 6.2
Tiempos de viraje (minutos)	120	270	240	240
	120	180	240	240
	90	180	210	240
	90	150	270	
	90	90	210	
<b>Mediana</b>	<b>90</b>	<b>180</b>	<b>240</b>	<b>240</b>

**Cuadro 8.** Prueba MW-U en la comparación de tiempos de viraje de la reducción de resazurina con jugo primario y con microbiota aislada (McFarland 1.0).

	Virajes con resazurina		Tamaño de muestra		Valor $U_a$	Nivel de significancia para $a$ Prueba no direccional $\alpha$ : 0.05		
	a: pH inicial 5.1	b: pH inicial 6.2	$N_a$	$N_b$		Límites del valor $U_a$ [Inferior, Superior]	Valor Z	Valor $p$
<i>a. Reacción jugo primario y resazurina</i>								
	<i>Viraje a rojo</i>							
Tiempos de viraje (mins)	180	30	5	5	<b>11.0</b>	[2, 23]	0.21	<b>0.8337</b>
	120	150						
	150	180						
	180	210						
	150	30						
Mediana (mins)	150	150						
	<i>Viraje a punto final</i>							
Tiempos de viraje (mins)	240	120	5	3	<b>1.5</b>	[1, 14]	--	--
	300	240						
	240	150						
	270							
	240							
Mediana (mins)	240	150						
<i>b. Reacción microbiota aislada del jugo (McFarland 1.0) y resazurina</i>								
	<i>Viraje a rojo</i>							
Tiempos de viraje (mins)	120	270	5	5	<b>21.5</b>	[2, 23]	-1.78	<b>0.0751</b>
	120	180						
	90	180						
	90	150						
	90	90						
Mediana (mins)	90	180						

	Virajes con resazurina		Tamaño de muestra		Valor $U_a$	Nivel de significancia para $a$ Prueba no direccional $\alpha$ : 0.05		
	a: pH inicial 5.1	b: pH inicial 6.2	$N_a$	$N_b$		Límites del valor $U_a$ [Inferior, Superior]	Valor Z	Valor $p$
	<i>Viraje a punto final</i>							
Tiempos de viraje (mins)	270	240	5	3	<b>9.0</b>	[1, 14]	--	--
	240	240						
	210	240						
	240							
	210							
Mediana (mins)	240	240						

*c. Concentración de sacarosa en la reacción jugo primario y resazurina*

Medianas de concentración de sacarosa (Molar)	0.04468	0.05720	9	9	<b>58.0</b>	[17, 64]	-1.50	<b>0.1336</b>
	0.04200	0.05260						
	0.03600	0.04095						
	0.03300	0.03933						
	0.03283	0.03570						
	0.03208	0.03430						
	0.02673	0.03352						
	0.02298	0.03310						
	0.02056	0.02514						
Mediana (Molar)	0.03283	0.03570						

**Cuadro 9.** Prueba de correlación de rango de Spearman y prueba de correlación de rango significativa como análisis de asociación lineal entre variables.

Variables	Coeficiente de correlación de rango de Spearman: $r_s$	Prueba de correlación de rango significativa ( $\alpha$ : 0.05)			Interpretación Correlación sugerida por $r_s$
		Desviación estándar: $\sigma_{r_s}$	Valor estadístico $Z$	Valor $p$	
<i>a. Reacción jugo primario y resazurina</i>					
<i>Resazurina pH inicial 5.1</i>					
pH y Recuento total de mesófilos aeróbios	<b>0.91</b>	0.35	2.57	<b>0.0102*</b>	Positiva
<i>Resazurina pH inicial 6.2</i>					
pH y Recuento total de mesófilos aeróbios	<b>0.97</b>	0.35	2.73	<b>0.0063*</b>	Positiva
<i>b. Reacción microbiota aislada del jugo (McFarland 1.0) y resazurina</i>					
<i>Resazurina pH inicial 5.1</i>					
pH y densidad óptica	<b>-1.91</b>	0.35	-5.40	<b>0.0001*</b>	Negativa
<i>Resazurina pH inicial 6.2</i>					
pH y densidad óptica	<b>-1.79</b>	0.35	5.07	<b>0.0001*</b>	Negativa
<i>c. Concentración de sacarosa en la reacción jugo primario y resazurina</i>					
<i>Resazurina pH inicial 5.1</i>					
pH y concentración de sacarosa	<b>-1.01</b>	0.35	-2.84	<b>0.0045*</b>	Negativa
Recuento total de mesófilos aeróbios y concentración de sacarosa	<b>-1.90</b>	0.35	-5.38	<b>0.0001*</b>	Negativa

Variables	Coeficiente de correlación de rango de Spearman: $r_s$	Prueba de correlación de rango significativa ( $\alpha: 0.05$ )			Interpretación
		Desviación estándar: $\sigma_{rs}$	Valor estadístico $Z$	Valor $p$	Correlación sugerida por $r_s$
<i>Resazurina pH inicial 6.2</i>					
pH y concentración de sacarosa	<b>-01.02</b>	0.35	-2.87	<b>0.0040*</b>	Negativa
Recuento total de mesófilos aeróbios y concentración de sacarosa	<b>-1.31</b>	0.35	-3.71	<b>0.0002*</b>	Negativa

\* El valor  $p$  es significativo ( $p < \alpha: 0.05$ ), rechazando la hipótesis nula de falta de correlación de rangos.

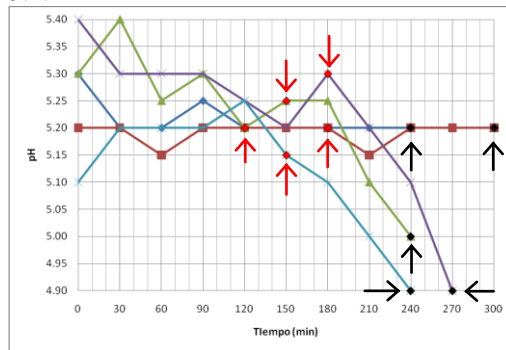
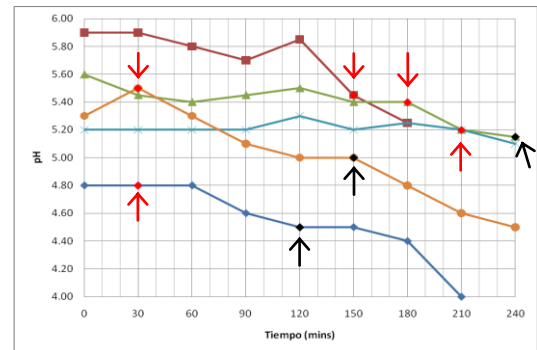
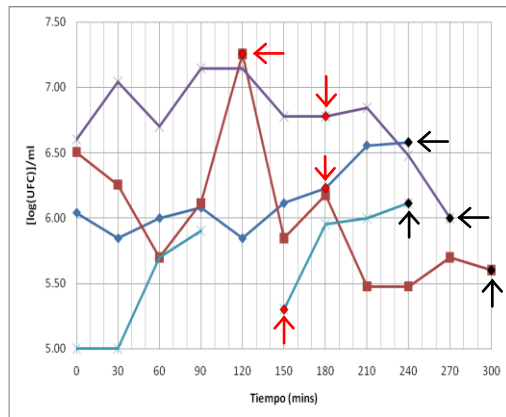
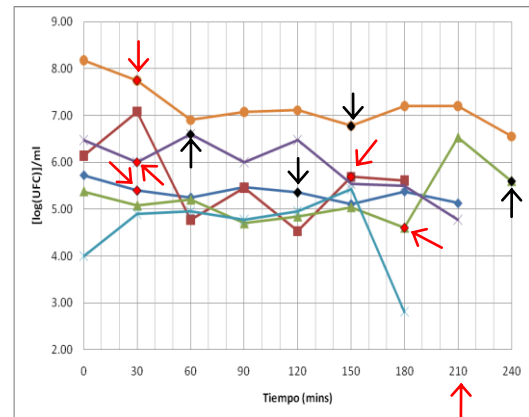
Para la prueba de correlación de rango, el valor de la Media  $\mu_{rs}=0$ .

**Cuadro 10.** Regresión logística de los tiempos de virajes en la reducción de resazurina con jugo primario y con microbiota aislada (McFarland 1.0).

Viraje	Regresión lineal ajustada: modelo logit				Probabilidad		
	Intercepto	Coeficiente: $\beta$	OR: $\exp(\beta)$	Coeficiente $R^2$	$\chi^2_{0.05}$	df	Valor $p$ ( $\alpha=0.05$ )
<i>a. Reacción resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo primario</i>							
A rojo	0.30	-2.20E-03	<b>0.9978</b>	0.05	0.06	1	<b>0.8017</b>
A punto final	1.86	-8.70E-03	<b>0.9913</b>	0.94	1.28	1	<b>0.2579</b>
<i>b. Reacción resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con microbiota aislada de jugo (McFarland 1.0)</i>							
A rojo	-1.92	1.22E-02	<b>1.0122</b>	0.54	2.13	1	<b>0.1446</b>
A punto final	-8.38	3.66E-02	<b>1.0373</b>	1.00	0.54	1	<b>0.4620</b>

## D. Gráficas

## 1. Variaciones particulares de la reducción de resazurina pH inicial 5.1 y 6.2 con jugo primario

**Figura 15.** Variación de pH durante la reducción de jugo con resazurina pH inicial 5.1.**Figura 16.** Variación de pH durante la reducción de jugo con resazurina pH inicial 6.2.**Figura 17.** Dinámica de la microbiota del jugo en la reducción con resazurina pH inicial 5.1.**Figura 18.** Dinámica de la microbiota del jugo en la reducción con resazurina pH inicial 6.2.

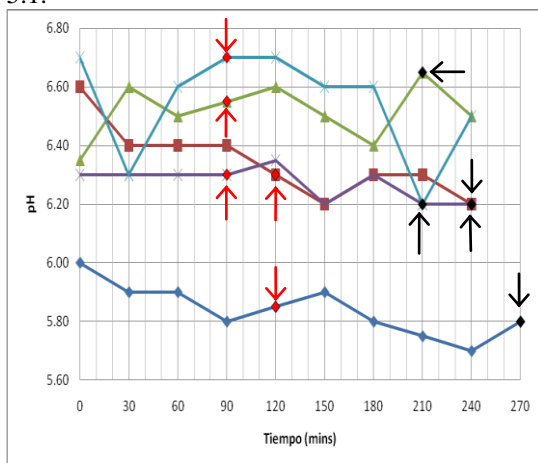
Nota: El tiempo de viraje a rojo de la Corrida 5 ocurrió a los 210 mins.

## Leyenda:

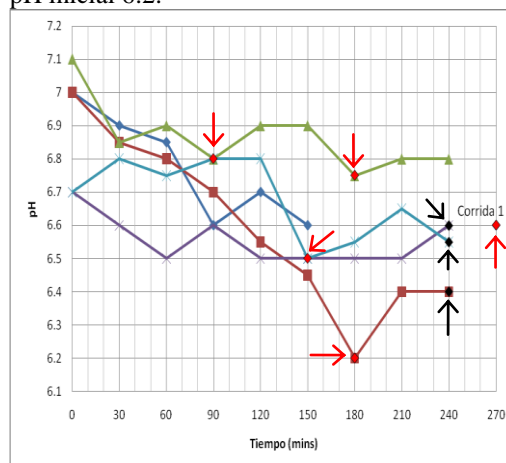
- |           |           |           |                      |
|-----------|-----------|-----------|----------------------|
| Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Viraje a rojo        |
| Corrida 4 | Corrida 5 | Corrida 6 | Viraje a punto final |

2. Variaciones particulares de la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2 con microbiota aislada de jugo primario (McFarland 1.0)

**Figura 19.** Variación de pH durante la reducción de microbiota aislada con resazurina pH inicial 5.1.

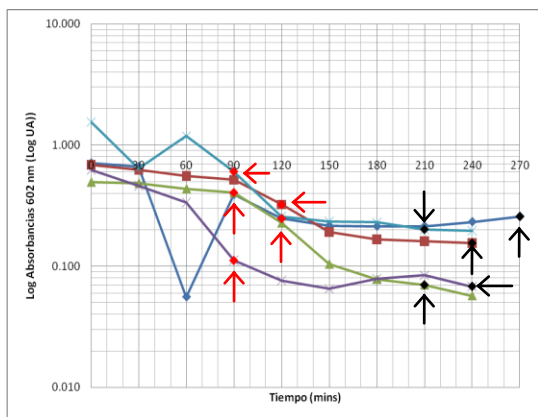


**Figura 20.** Variación de pH durante la reducción de microbiota aislada con resazurina pH inicial 6.2.

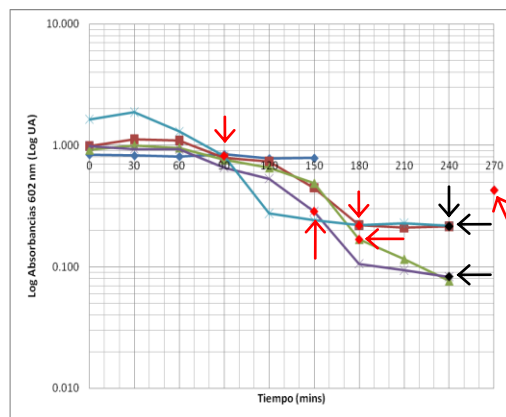


Nota: El tiempo de viraje a rojo de la Corrida 1 ocurrió a los 270 mins.

**Figura 21.** Dinámica de la microbiota aislada del jugo en la reducción con resazurina pH inicial 5.1.



**Figura 22.** Dinámica de la microbiota aislada del jugo en la reducción con resazurina pH inicial 6.2.



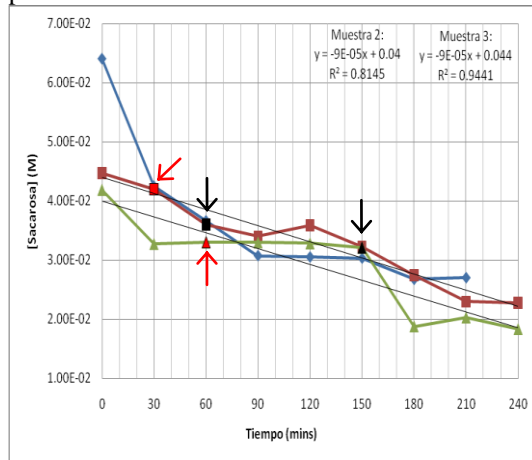
Nota: El tiempo de viraje a rojo de la Corrida 1 ocurrió a los 270 mins.

**Leyenda:**

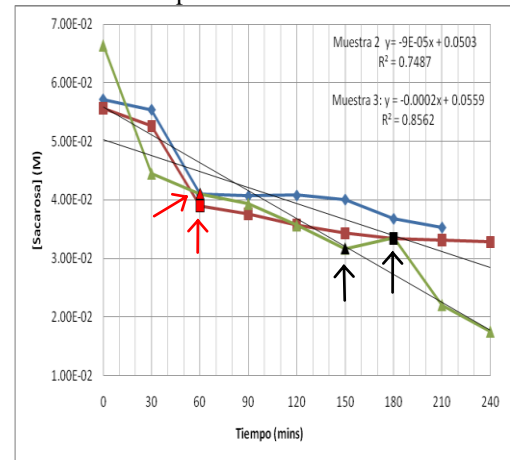
Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Viraje a rojo
Corrida 4	Corrida 5		Viraje a punto final

3. Variaciones particulares de la cuantificación de concentración de sacarosa en la reducción de resazurina pH inicial 5.1 o 6.2 con jugo primario

**Figura 23.** Variación de concentración de sacarosa durante la reducción de jugo primario con resazurina pH inicial 5.1.



**Figura 24.** Variación de concentración de sacarosa durante la reducción de jugo primario con resazurina pH inicial 6.2.



Leyenda:

	Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3
	Viraje a rojo		Viraje a punto final		