



ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR ULTRAVIOLETA COMO UNA HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS ATCC 25922 Y ATCC 35218 DE *ESCHERICHIA COLI*

Pedro Matheus¹, Eliana Ramírez¹, Judith Araque², Olga Belandria¹, Jessica Durán¹

- 1. Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Análisis y Control. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.**
- 2. Laboratorio de Microbiología del Agua. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.**

Correspondencia: Laboratorio de Análisis Instrumental. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. Teléfono: 0274-2403438.

E-mail: pmateus@ula.ve

RESUMEN

Se estudió la curva de crecimiento de cepas ATCC 25922 y ATCC 35218 de *Escherichia coli* en medio de cultivo Tripticasa de Soya y cultivadas durante 24 horas, provenientes del Laboratorio de Microbiología del Agua de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en Mérida-Venezuela, utilizando la técnica de Espectrofotometría de Absorción Molecular Ultravioleta. Se realizó un barrido espectral desde 240 a 290 nm, obteniéndose el pico de máxima absorción a longitud de onda de 260 nm para ambas cepas. Fueron determinadas las fases de las curvas de crecimiento, a diferentes pH (7,0; 5,0 y 9,0) y diferentes temperaturas (37°C y 25°C). Los resultados obtenidos a las 48 horas del crecimiento de las cepas, muestran una disminución del pH independientemente del pH inicial del medio. Así mismo, se observa mayor acidificación en los cultivos con la cepa ATCC 35218 que en los cultivos con ATCC 25922. Los resultados indican



que las condiciones ideales para el crecimiento de ambas cepas son pH 7,0 y temperatura de 37°C, aunque la bacteria se adaptó y creció a pH 9,0 y 25°C. El método resultó ser sencillo, rápido y específico para estudiar la curva de crecimiento de ambas cepas.

PALABRAS CLAVE: Espectrofotometría, longitud de onda, *Escherichia coli*, curva de crecimiento, cepa ATCC 25922, cepa ATCC 35218.

MOLECULAR ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY UV AS A TOOL TO STUDY THE GROWTH OF STRAINS ATCC 25922 AND ESCHERICHIA COLI ATCC 35218

ABSTRACT

The growth curve of ATCC 25922 and ATCC 35218 strains *Escherichia coli* in culture medium Trypticase Soy studied and cultured for 24 hours, from the Water Microbiology Laboratory of the Faculty of Pharmacy and Bioanalysis of University of Los Andes in Mérida, Venezuela, using the technique of Molecular Absorption Spectrophotometry Ultraviolet. Was performed a spectral scan from 240 to 290 nm, yielding the maximum absorption peak wavelength of 260nm for both strains. Phases were determined from the growth curves for both strains, at different pH values (7.0, 5.0 and 9.0) and different temperatures (37 °C and 25 °C). The results obtained after 48 hours of growth of the strains, showing a decrease in pH regardless of the initial pH of the medium. Likewise, further acidification is observed in cultures with ATCC 35218 strain than in cultures with the ATCC 25922. The results indicate that the ideal conditions for the growth of both strains is pH 7.0 and a temperature of 37 °C, although the bacteria adapted and grew with a pH of 9.0 and a temperature 25 °C. We conclude that the method proved to be simple, fast and specific to study the growth curve of both strains.

KEY WORDS: spectrophotometry, wavelength, *Escherichia coli*, growth curve, ATCC 25922 strain, ATCC 35218 strain.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es el organismo procariota de vida libre que mejor se ha estudiado. Esta bacteria se encuentra generalmente en el tracto gastrointestinal del hombre y los animales^(1,2) *E. coli* posee propiedades bioquímicas que permiten su identificación; las pruebas diseñadas para tal fin y que se basan en descartar la presencia de otros bacilos gram negativos son: Crecimiento en agar Mac Conkey, Prueba de oxidasa, Agar Kligler, Agar lisina hierro (LIA), Medio motilidad-indol-ornitina (MIO), Citrato, Urea, Fenilalanina desaminasa, Prueba de Vorges Proskauer (VP), Prueba de rojo metilo(1,2,3,4). Pocos estudios se han reportado utilizando técnicas de Espectrofotometría de Absorción Molecular Ultravioleta, uno de ellos el realizado por Alupoaei C. y Garcia-Rubio L., quienes en el 2004 estudiaron el crecimiento de la cepa ATCC 25922 a diferentes longitudes de onda (5,6,7). Existen varios factores que influyen en el crecimiento de *E. coli* entre los que

destacan: el pH, la temperatura, el oxígeno y los nutrientes. El pH es un parámetro crítico en el crecimiento de los microorganismos, ya que cada uno tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente(8). En el caso de *E. coli*, la misma tiene un pH óptimo de crecimiento entre 6,0 y 7,0 con un límite inferior de 4,4 y un límite superior de 9,0 lo que la incluye en el grupo de los microorganismos neutrófilos (9). Las variaciones intensas de pH pueden dañar al microorganismo alterando la membrana plasmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y las proteínas transportadoras. La temperatura también tiene efectos sobre *E. coli*, ésta al ser un microorganismo mesófilo, posee una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C, una mínima de 10 °C y una máxima de 45 °C. Aunque estos valores pueden presentar pequeñas variaciones según los medios empleados, la temperatura óptima siempre está más próxima a la máxima que a la mínima, pudiendo crecer incluso a la máxima temperatura ya que son organismos

termotolerantes, condición que los diferencia de los demás coliformes (8,9). Cambios bruscos en la temperatura traen consecuencias negativas para el crecimiento celular, en el caso de temperaturas muy elevadas se produce la desnaturalización de enzimas, proteínas transportadoras y otras proteínas, así como el deterioro de las membranas microbianas (9). Si por el contrario la temperatura es baja, la falta de crecimiento se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones químicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos, impidiendo el funcionamiento de la membrana celular (8). En cuanto al oxígeno, *E. coli* es un microorganismo aerobio facultativo, cuando el oxígeno está disponible, lo utiliza como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, y en ausencia de éste, la energía la obtienen por fermentación o respiración anaerobia (8). Por último, algunos microorganismos pueden crecer a partir de una gran variedad de nutrientes (fuentes de carbono y de energía) como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, compuestos aromáticos, entre otros. *E. coli* se

desarrolla con rapidez (en 20 minutos a 37 °C) en un medio sencillo que contenga solamente glucosa como fuente de carbono e iones amonio como fuente de nitrógeno (8,10).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras microbiológicas utilizadas en esta investigación fueron las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y ATCC 35218 en medio de cultivo Tripticasa de Soya, provenientes del Laboratorio de Microbiología del Agua de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Se utilizó Agar BHI para inocular y activar las cepas bacterianas. Para realizar el contaje de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) e inocular las últimas dos diluciones seriadas para la siembra por extensión, se utilizó Agar tripticasa de soya. El buffer utilizado en este estudio fue buffer fosfato 0,1 M. Se utilizaron reactivos de grado analítico y agua ultrapura (*Millipore*) con una resistividad específica de 18 Ω .cm. Para la preparación de la suspensión microbiana fue utilizado Patrón 0,5 de Mc Farland que corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de *E. coli* de $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL (11). Todos los

procedimientos ejecutados durante este trabajo fueron realizados bajo condiciones de esterilidad y por separado para cada una de las cepas utilizadas, según las normas del Laboratorio de Microbiología del Agua de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela). Para las medidas espectrofotométricas fueron utilizadas celdas de cuarzo de 3 mL de capacidad. El material de vidrio fue previamente lavado con solución sulfocrómica (20 g. de $K_2Cr_2O_7$ disueltos en 180 mL de agua y 720 mL de ácido sulfúrico); **debe tenerse extremo cuidado al manipular esta solución.** Seguidamente el material fue lavado con abundante agua destilada y finalmente con agua ultrapura (18 M Ω).

Equipos

Para la técnica de siembra por extensión se colocó en el centro de una placa de agar, un pequeño volumen de la muestra microbiana diluida, conteniendo entre 100 y 200 células; se extendió uniformemente sobre la superficie, con la ayuda de una varilla de vidrio estéril doblada. Para las medidas

espectrofotométricas fue utilizado un Espectrofotómetro de Absorción Molecular JENWAY 6405, utilizando celdas de cuarzo de 3 mL de capacidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizada la siembra por extensión y posterior obtención de las muestras, se procedió a realizar las medidas espectrofotométricas para ambas cepas (de forma progresiva hasta alcanzar las 48 horas de siembra), ajustando previamente el equipo a cero de absorbancia con el blanco de agua ultrapura (18 M Ω .cm), a longitud de onda de 260 nm; así mismo, se realizó la medida de absorbancia a 260 nm para el medio de cultivo Tripticasa de Soya; debido a que este medio absorbe luz a dicha longitud de onda, el valor debe ser restado de la absorbancia de cada muestra. Estas mediciones fueron realizadas a 37°C y pH 7,0. La longitud de onda fue seleccionada después de realizar un barrido espectral para cada cepa, obteniéndose en ambos casos, mayor absorbancia a λ igual a 260 nm. Esto indica que no es posible diferenciar entre ambas cepas cuando comparamos sus valores de

absorbancia entre sí, al menos si los barridos se realizan a 37°C y pH 7,0.

del pH para las cepas ATCC 25922 y ATCC 35218 al inicio y al final del estudio (luego de 48 horas de sembradas).

Variación de pH para cada cepa estudiada.

En la tabla 1 se observa el comportamiento

Tabla 1. Variación de pH para las cepas ATCC 25922 y ATCC 35218 al inicio y al final del estudio. Temperatura de 37 °C.

Cepa	pH inicial	pH final
ATCC 25922	7,0	6,5
ATCC 35218	7,0	5,0
ATCC 25922	5,0	4,5
ATCC 35218	5,0	4,5
ATCC 25922	9,0	7,0
ATCC 35218	9,0	6,5

Los resultados presentados en la tabla 1, muestran una disminución del pH (a las 48 horas de crecimiento de cada cepa), independientemente de las condiciones iniciales del medio en estudio y de la cepa utilizada. Estos resultados confirman lo propuesto por Prescott y colaboradores en 1999, quienes exponen que *E. coli* al ser un microorganismo fermentador produce ácidos orgánicos a partir de los hidratos de carbono, acidificándose el medio a medida que el crecimiento de la cepa avanza (9). Así mismo, se observa mayor acidificación en el cultivo

con la cepa ATCC 35218 que en el cultivo con la cepa ATCC 25922, excepto a pH 5,0, donde la acidificación es igual para ambos cultivos.

Absorbancias de las cepas ATCC 25922 y ATCC 35218 a distintos tiempos.

En la tabla 2 se observan los resultados de las absorbancias obtenidas para cada cepa a los distintos tiempos. Estos resultados se obtuvieron sin diluir las muestras, con la metodología analítica descrita anteriormente, para así obtener un panorama general de la

curva de crecimiento de ambas cepas. Las muestras no fueron procesadas por el método de siembra por extensión, debido a que la metodología sugiere que se trabaje con muestras diluidas. La máxima absorbancia

para la cepa ATCC 25922 se obtuvo a las 30 horas y para la cepa ATCC 35218 a las 27 horas.

Tabla 2. Absorbancias de las cepas ATCC 25922 y ATCC 35218 a distintos tiempos.

Tiempo (horas)	0	3	6	9	12	24	27	30	33	36	48
*Absorbancia ATCC 25922	0,00	0,06	0,14	0,15	0,17	0,26	0,27	0,37	0,29	0,31	0,27
*Absorbancia ATCC 35218	0,00	0,19	0,26	0,24	0,24	0,31	0,34	0,30	0,28	0,21	0,30

*Las absorbancias reportadas son el resultado de 3 medidas para cada muestra y resultan de restar la Absorbancia del cultivo de Tripticasa de Soya de la Absorbancia obtenida para cada cepa.

Los resultados de la tabla 2 aparecen representados en la figura 1, donde se muestran las Curvas de Crecimiento de las cepas ATCC 25922 y ATCC 35218 de *E. coli*. En ninguna de las cepas se observa fase de latencia, posiblemente porque el microorganismo se encuentra adaptado, ya que previamente se encuentra bajo condiciones de temperatura, aireación y nutrición, similares a las de este cultivo tal como lo indican Garzón y Gómez en el 2007 y Prescott y col. en 1999 (10,11), quienes establecieron que cuando se transfiere un

cultivo en fase de crecimiento vigoroso a un medio nuevo de la misma composición, la fase de latencia se acorta o no se produce (8,9). Las curvas de crecimiento comienzan en ambas cepas con la fase exponencial, en la cepa ATCC 25922 va desde 0 horas hasta 24 horas y en la cepa ATCC 35218 desde 0 horas hasta 6 horas y luego una fase estacionaria muy fluctuante que abarca en la cepa ATCC 25922 desde la 24 horas a las 48 horas y en la cepa ATCC 35218 desde las 6 horas a las 48 horas cuando finaliza el estudio. En ambas

cepas tampoco se observa fase de muerte, esto coincide con lo señalado por Santos y col. en el 2005, que establecieron que la fase estacionaria se mantiene después de semanas de ayuno debido a un metabolismo basal, lo que explica que la fase de muerte no sea apreciada a las 48 horas (12). De igual forma

Garzón y Gómez en el 2007 reportaron que un pequeño número de células persisten en cultivo por meses o años, posiblemente porque las células consiguen crecer gracias a los nutrientes liberados por las células que mueren y se lisan (8).

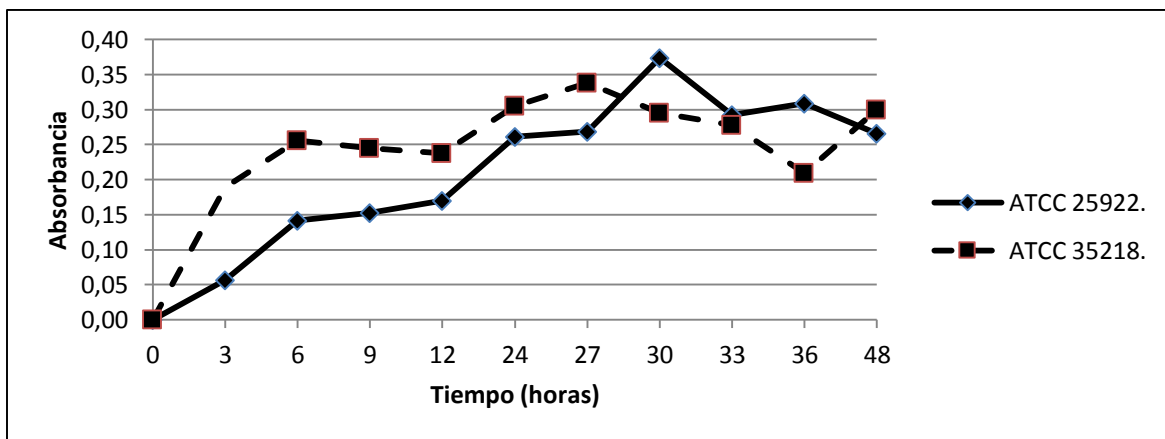


Figura 1. Curvas de crecimiento para las cepas ATCC 25922 y ATCC 35218 a distintos tiempos.

Efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa ATCC 25922. En la figura 2 se presentan las absorbancias obtenidas a distintos tiempos para la cepa ATCC 25922

cultivada a 37°C y 25°C respectivamente, obtenida por diluciones seriadas (factor de dilución igual a 8). La muestra fue cultivada en caldo Tripticasa de Soya, con un pH de 7,0.

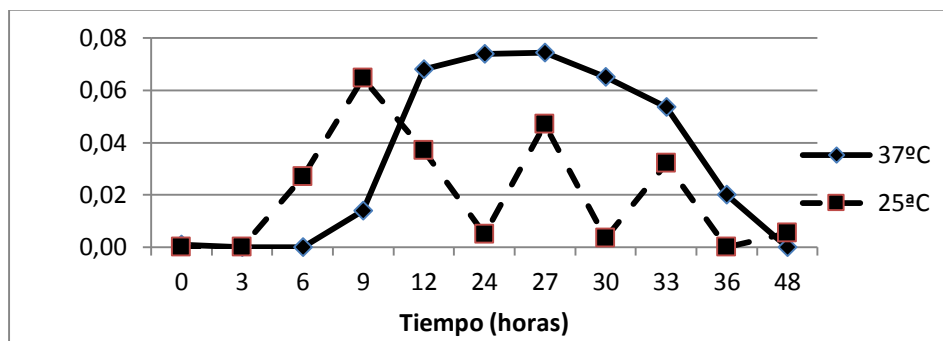


Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa ATCC 25922 a temperaturas de 37°C y 25°C.

Los resultados confirman que la temperatura óptima de crecimiento de *Escherichia coli* es de 37°C, ya que en estas condiciones se observan todas las fases de crecimiento, lo que coincide con Garzón y Gómez en el 2007, Santos y col. en el 2005 y Prescott y col. en 1999, quienes llegan a las mismas conclusiones. A 37°C se observa una fase de latencia (0-6 horas), una fase exponencial (6-12 horas), una fase estacionaria (12-33 horas) y por último una fase de muerte (33-48 horas). Todas las fases a diferencia de la de transición B están bien delimitadas, esto se debe posiblemente al tiempo transcurrido entre una medición y las siguientes (12 horas) que es donde ocurre dicha fase. En cuanto a los resultados obtenidos para el cultivo incubado a 25°C, los resultados obtenidos

concuerdan con lo publicado por Buchanan y Klawitter en 1992, quienes demostraron que por debajo de 37°C el crecimiento del microorganismo es menor (13). A 25°C sólo se observa la fase de latencia y la fase exponencial y luego cae de forma brusca y comienza a fluctuar, por lo tanto no son resultados confiables para determinar la curva de crecimiento. Según lo expuesto por Garzón y Gómez en el 2007, estos resultados se atribuyen a que a bajas temperaturas disminuye la velocidad de las reacciones químicas y los lípidos de las membranas pasan de ser fluidos a cristalinos.

Efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa ATCC 35218. En la figura 3 se presentan las absorbancias obtenidas a distintos tiempos para la cepa ATCC 35218

cultivada a 37°C y 25°C respectivamente, obtenida por diluciones seriadas (factor de dilución igual a 8). En la gráfica se observa que el estudio de la cepa ATCC 35218 a temperaturas de 37°C y 25°C revela un comportamiento similar a lo observado en la cepa ATCC 25922, en donde la cepa cultivada a 37°C presenta una fase de latencia hasta las 6 horas y luego una fase exponencial más prolongada (6–27 horas) que en la cepa

ATCC 25922, luego cae y se eleva de forma brusca y entra en fase estacionaria que continua a fase de muerte. Con respecto a la cepa ATCC 35218 cultivada a 25°C, a diferencia de la cepa ATCC 25922, se puede decir que es mucho más estable, ya que se observan todas las fases de crecimiento a excepción de la fase de latencia, la cual se presenta claramente en la cepa ATCC 25922.

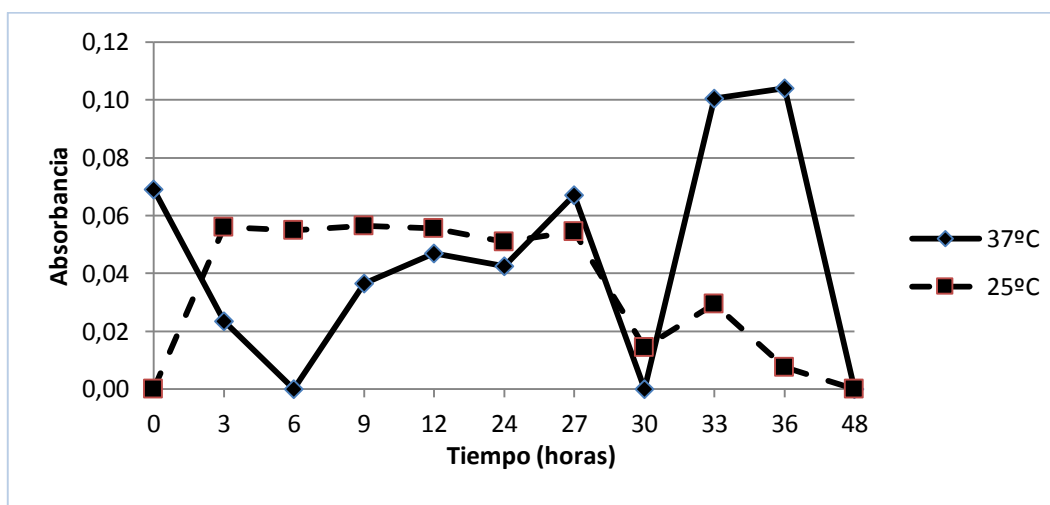


Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa ATCC 35218 a temperaturas de 37°C y 25°C.

Con estos resultados no se puede afirmar que para la cepa ATCC 35218 la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, tal como lo reportaron Garzón y Gómez en el 2007 y

Prescott y colaboradores en 1999, ya que se observa un comportamiento irregular en la fase estacionaria. Al comparar las absorbancias en la fase estacionaria, éstas son

mayores a 37°C que a 25°C, así que, probablemente después de las 30 horas, el error humano unido a la sensibilidad del método causó este comportamiento.

Curvas de crecimiento de la cepa ATCC 25922 a distintos valores de pH. La figura 4 muestra las curvas de crecimiento de la cepa ATCC 25922 a pH de 7,0, 5,0 y 9,0. El estudio se realizó a 37 °C y Tripticasa de Soya como medio de cultivo.

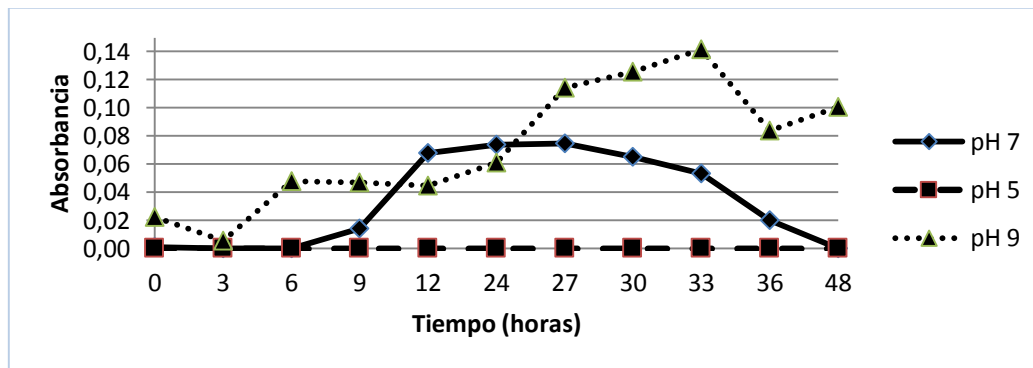


Figura 4. Curvas de crecimiento de la cepa ATCC 25922 a distintos valores de pH. Temperatura 37 °C.

A pH 7,0 se observa mayor estabilidad y en la gráfica correspondiente se visualizan todas las fases de la Curva de Crecimiento; presenta la fase de latencia (0-6 horas), la fase exponencial (6–12 horas), la fase estacionaria (12–33 horas) y por último la fase de muerte (33–48 horas); estos resultados confirman lo publicado por Prescott y colaboradores en 1999 quienes exponen que el pH óptimo de crecimiento para *Escherichia coli* se encuentra entre 6,0 y 7,0; así mismo, Garzón y Gómez en el 2007 concluyen que el pH

intracelular de *E. coli* es de 7,6; es decir, un valor ligeramente superior al pH del medio de cultivo pero necesario para la obtención de energía metabólica. En el caso de la cepa cultivada en un medio de cultivo con pH 5,0 se observa que ésta no creció y por ende las fases de la Curva de Crecimiento no pueden observarse. Según Prescott y colaboradores en 1999, un pH ácido daña al microorganismo, alterando la membrana plasmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y las proteínas transportadoras,

evitando así el crecimiento celular como se observa en la figura 4. La misma cepa cultivada en un medio con pH 9,0 se adaptó mejor a las condiciones y por ende creció. Presenta una fase de latencia (0-3 horas), debido al proceso de adaptación a un pH superior a su pH óptimo, luego una fase exponencial (3-6 horas) que continúa a su fase estacionaria, no muy clara, sino que por el contrario después de mantener una estabilidad (6-12 horas), la carga celular aumenta de forma exponencial (12-27 horas) y luego entra nuevamente a fase estacionaria (27-33 horas). Finalmente entra en fase de muerte, aunque a las 48 horas hay un ligero incremento de la absorbancia. Todos estos cambios se deben a que la bacteria se encuentra en un medio no óptimo para su crecimiento, pero no tan agresivo como para inhibirlo. Además, es importante mencionar que las bacterias al multiplicarse acidifican el medio en el que se encuentran, al producir

ácidos orgánicos a partir de los hidratos de carbono, como en el caso de *Escherichia coli*, tal como exponen Prescott y colaboradores en 1999. Probablemente debido a esta característica es que las bacterias luego de entrar en fase estacionaria entran nuevamente a fase exponencial, ya que luego de varias divisiones, el medio se ha acidificado y muchos de los microorganismos se reproducen más fácilmente. Al entrar nuevamente en fase estacionaria, no hay más crecimiento debido a la disminución de los nutrientes o a la acumulación de residuos, condiciones necesarias establecidas (14).

Curva de crecimiento de la cepa ATCC 35218 a distintos valores de pH. La figura 5 muestra las curvas de crecimiento de la cepa ATCC 35218 a pH 7,0, 5,0 y 9,0. El estudio se realizó a 37 °C y Trypticase de Soya como medio de cultivo.

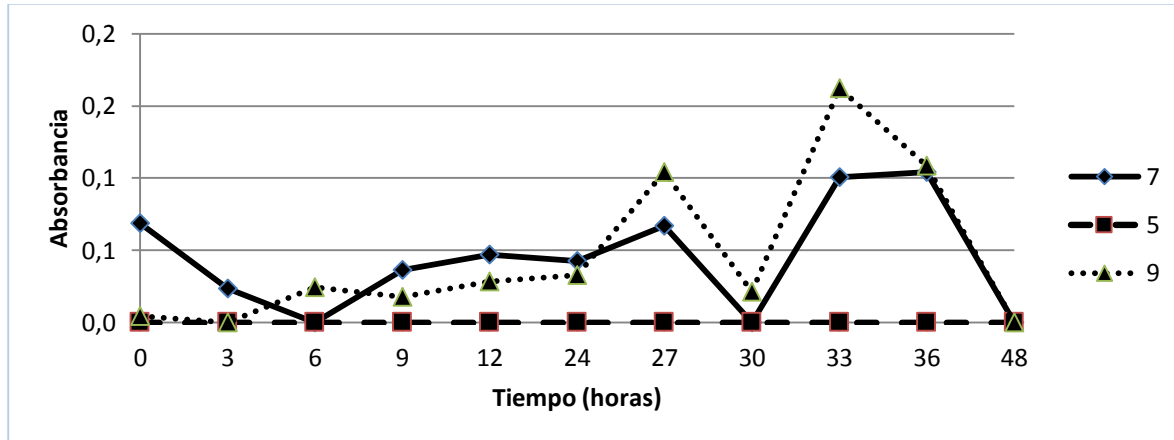


Figura 5. Curvas de crecimiento de la cepa ATCC 35218 a distintos valores de pH. Temperatura 37 °C.

A pH 7,0 se obtiene una Curva de Crecimiento característica, excepto por el resultado reportado a las 30 horas que cae de forma brusca e irregular con respecto al comportamiento normal de la fase estacionaria, pero, como se explicó en los resultados anteriores, no es un valor a tomar en cuenta debido a que por el método de siembra por extensión (resultados no presentados) se confirma el crecimiento normal de la cepa. Por tanto se confirma lo reportado por Prescott y colaboradores en 1999 quienes concluyeron que el pH óptimo de crecimiento para *Escherichia coli* oscila entre 6,0–7,0. En el cultivo a pH 5,0 el comportamiento es igual que en la cepa ATCC 25922, no hubo crecimiento y por

ende no se puede elaborar una Curva de Crecimiento. A pH 9,0 la cepa ATCC 35218 presenta un comportamiento similar al de la cepa ATCC 25922, en primer lugar tenemos una fase de latencia (0–3 horas), seguidamente una fase exponencial muy corta, sólo de 3 horas, y luego una fase estacionaria que se mantiene estable hasta las 24 horas, para luego aumentar la concentración de forma exponencial. Probablemente estos resultados se deben a la acidificación del medio a medida que ocurren las divisiones, así las bacterias al encontrarse en un medio menos agresivo y parecido a sus condiciones óptimas, crecen con mayor facilidad.

CONCLUSION

La *Escherichia coli* tiene la capacidad de absorber las radiaciones electromagnéticas, ya que se tiene un pico máximo de absorción a los 260nm, longitud de onda a la cual ambas cepas absorben mayor cantidad de luz; esto indica que la espectrofotometría es un método confiable para asegurar la presencia de *E. coli*, aunque no fue capaz de diferenciar entre las cepas ATCC 25922 y ATCC 35218, debido a que no se observan diferencias significativas en cuanto a sus fases de crecimiento. Los resultados obtenidos en esta investigación, indican que la temperatura óptima de crecimiento de *Escherichia coli* es de 37°C. A temperaturas menores, el crecimiento es mínimo. En cuanto al pH óptimo para el crecimiento de *E. coli*, el valor obtenido fue 7,0; a pH inferiores, disminuye el crecimiento o incluso se inhibe y a pH por encima de 7,0, aunque disminuye el crecimiento, es más fácil la adaptación de la bacteria en este tipo de medios. La Espectrofotometría UV-visible permite la determinación de las fases de crecimiento de *Escherichia coli* (latencia, exponencial,

estacionaria y muerte), aunque no permitió establecer diferencias significativas entre las cepas utilizadas. La Espectrofotometría UV-visible resultó ser un método menos sensible que la Siembra por Extensión, lo que se debe a que cuando el número de colonias es muy alto, la turbidez de la muestra, no permite medir la absorbancia con precisión. Sin embargo, la técnica espectrofotométrica presenta otras ventajas frente a la Siembra por Extensión, ya que es un método más sencillo, rápido y económico. Las condiciones previas del cultivo donde se encuentra la bacteria, el tiempo de incubación de la misma y las características del nuevo medio de cultivo son circunstancias claves para la curva de crecimiento de *Escherichia coli*, ya que determinan la presencia o ausencia de ésta y el tiempo de algunas fases.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a los Laboratorios de Microbiología del Agua y de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela) por facilitar el material

microbiológico y los reactivos necesarios para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. W. y William R. Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana; 1983. p. 2788-91
2. Murray P.; Kobayashi G.; Pfaller M. y Rosenthal K. Microbiología Médica. 6 ed. Madrid (España): Harcourt Brace; 1997. p. 323-30.
3. Ramírez A.; García E.; Longa A.; Sánchez K.; Nieves M.; Velasco J.; Araque M. y Mosqueda N. Manual Práctico de Bacteriología General. 1era ed. Venezuela: Editorial venezolana C.A.; 2006.
4. Velasco J.; Araque M.; Araujo E.; Longa A.; Nieves B.; Ramírez A.; Sánchez K. y Velasco E. Manual Práctico de Bacteriología Clínica. 1era ed. Venezuela: Editorial venezolana C.A.; 2008. p. 186.
5. Alupoaei C. y García-Rubio L. Growth behavior of microorganisms using UV-Vis Spectroscopy: *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering. 2004; 86(2):163-167.
6. Alupoaei, C. y García-Rubio, L. An interpretation model for the UV-Vis spectra of microorganisms. Chemical Engineering Communications. 2005; 192: 198-218.
7. Priyanka V.; Shruti Ch.; Mayank Ch.; Ramanathan K. y Shanthi V. Comparison of sterilization reaction rate for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* using UV-visible spectroscopy. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014; 6(5): 1095-1100
8. Garzón A. y Gómez J. Evaluación de la cinética de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 25922, y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleando buffer fosfatos. [Trabajo de Grado]. Colombia (Bogotá): Pontificia Universidad Javeriana; 2007.

9. Prescott L.; Harley J. y Klein D. Microbiología. 4ta ed. España (Madrid): McGraw-Hill interamericana; 1999. p. 114-29.
10. Lehninger A. Bioquímica. 2ed. España (Barcelona): Ediciones Omega, S.A; 1978. p. 32, 192-3.
11. ICONTEC. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2000). NTC 2455. Desinfectantes. Limpiadores líquidos. Desinfectantes para uso doméstico. Tercera actualización. 25-10-2000.
12. Santos J.; Ferrat G. y Gómez M. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2005; 47(3-4): 92-101.
13. Buchanan R. y Klawitter L. The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiology. 1992; 9(3): 185-196.
14. Nyström T. Stationary-Phase Physiology. Annual Reviews Microbiology. 2004; 58: 161-81.