

Recobrado de *Shigella* spp. conservada por la técnica de secado en perlas de vidrio

Recovery of *Shigella* spp. preserved on glass beads by dehydration technique

MSc. Zulia Weng Alemán,^I Lic. Zuleydis Echevarría Aguinar,^I MSc. Geominia Maldonado Cantillo,^I Lic. Inalvis Álvarez Molina,^{II} Lic. Marilén Rodríguez Menéndez^I

^I Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). La Habana, Cuba.

^{II} Hospital Docente Infantil "William Soler". Laboratorio de Microbiología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la técnica de secado en perlas de vidrio se reporta como método de conservación microbiana desde hace varios años, pero la información existente es limitada. Con este antecedente, se decidió evaluar su utilidad para conservar bacterias, de origen clínico, en la colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.

Métodos: se estudiaron dos cultivos de *Shigella* spp., mantenidas en refrigeración. Los datos de viabilidad obtenidos durante cuatro años de conservación fueron procesados con el paquete estadístico SPSS versión 15.0. El análisis estadístico incluyó el de la varianza para la comparación de las medias del recobrado de células viables para las variables tiempo de conservación, dilución y mezcla preservante, y el *test* de Scheffé de comparaciones múltiples *post hoc* para la discriminación de las medias. Fueron controladas las características fisiológicas y la respuesta a la tinción de Gram de las cepas.

Resultados: no se encontraron diferencias significativas entre las mezclas preservantes utilizadas en este ensayo, y pudieron recobrase ambas cepas durante los cuatro años de estudio. A partir de los seis meses se apreció una disminución del efecto protector en todas las mezclas. Se obtuvo variabilidad en algunos caracteres fisiológicos (indol, dulcitol y manitol), pero no para la respuesta a la tinción de Gram en ambas cepas, la que se mantuvo estable.

Conclusiones: el método resultó apropiado para mantener *Shigella* spp. por tiempo limitado, pero pudiera utilizarse como alternativa de conservación en laboratorios con limitados recursos a corto plazo, por su sencillez, bajo costo y efectividad, y debe garantizarse la disponibilidad de réplicas por otras técnicas.

Palabras clave: *Shigella* spp., conservación, secado en perlas, técnica simple.

ABSTRACT

Introduction: glass bead dehydration technique has been reported as a microbial preservation method for some years, but the available information is limited. Based on this antecedent, it was decided to evaluate its usefulness to preserve bacteria of clinical origin in the collection of microbial cultures at the National Institute of Hygiene, Epidemiology and Microbiology.

Methods: a study was conducted of two *Shigella* spp. cultures kept under refrigeration. The viability data obtained during four years of preservation were processed with the statistical package SPSS, version 15.0. Statistical processing included analysis of variance for comparison of the mean recovery values of viable cells for the variables preservation time, dilution and preserving mix, and Scheffe's test of post hoc multiple comparisons for means discrimination. Physiological characteristics were controlled, as well as the response of strains to Gram stain.

Results: no significant differences were found between the preserving mixes used in the trial, and both strains could be recovered during the four years of the study. The protective effect of all mixes was found to decrease after six months. Variability was obtained for some physiological characters (indol, dulcitol and mannitol), but response to Gram stain remained stable in both strains.

Conclusions: the method was found to be suitable to preserve *Shigella* spp. for a limited time, but it could be used as a short-term preservation alternative in laboratories with few resources, due to its simplicity, low cost and effectiveness. Availability should be ensured of replicas obtained by other techniques.

Key words: *Shigella* spp., preservation, dehydration on beads, simple technique.

INTRODUCCIÓN

La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación.^{1,2} Múltiples técnicas se encuentran disponibles para esto, y se identifican tres categorías en las que ellas se pueden agrupar acorde con el tiempo en que permanecen viables las células conservadas: conservación a largo plazo, donde clasifican la congelación y la liofilización; conservación a mediano plazo, que comprende la desecación en diferentes soportes, así como el almacenamiento en tierra y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar), y la conservación a corto plazo, donde se incluye la resiembra periódica.¹⁻⁶

La conservación a mediano plazo es el término que agrupa las técnicas con las que se logra mantener la viabilidad de los cultivos entre dos y cinco años. Se destaca en este grupo la desecación en diferentes soportes (arena, zeolita, sílica gel, gelatina, papel, perlas de vidrio) donde la paralización del crecimiento se produce por eliminación del agua disponible,^{1,2} como el almacenamiento en tierra y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar), métodos bien documentados, en especial para los hongos, lo que no descarta su uso para la conservación de bacterias según reportes de varios autores.^{1,3,7}

Todas estas técnicas de conservación a mediano plazo, en general, tienen en común su relativo bajo costo y fácil aplicación, ventajas que sugieren su empleo como alternativa válida en laboratorios con recursos limitados. No obstante, debe considerarse su empleo para la preservación de dos a cinco años y mantenerse también una reserva por métodos a largo plazo.⁸

A pesar de esta variedad no existe una técnica universal para conservar adecuadamente todos los microorganismos; de aquí la necesidad de evaluar varias técnicas de preservación hasta encontrar la más factible de aplicar a los microorganismos mantenidos en la colección, adecuándola a la situación real de la organización. En el caso de que no se disponga de todos los recursos para establecer métodos de conservación a largo plazo, se hace necesario contar con métodos alternativos como herramientas que nos ofrecen otras posibilidades.

El empleo de microorganismos conservados en las colecciones de cultivos microbianos para el control de procesos tecnológicos, en la evaluación de diagnosticadores, medios de cultivos, sistemas comerciales de identificación, así como en las investigaciones, la docencia y como patrones en el examen microbiológico de muestras clínicas y en el análisis ambiental (alimentos, agua, suelo y aire), se incrementa cada día. Igualmente, se hacen mayores las estadísticas de morbimortalidad por enfermedades infecciosas causadas por dichos agentes biológicos, lo que constituye uno de los factores de riesgo que afecta la salud humana y el ambiente. Por esta razón, también contribuye a la salvaguarda de especies patógenas representativas para estudios específicos.⁹

En este sentido, la colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CCINHEM),¹⁰ que mantiene bacterias de origen ambiental, en su mayoría, y algunas cepas tipo que son ofertadas a los laboratorios de la Red Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología como materiales básicos de trabajo, ha trabajado desde hace algún tiempo en la evaluación de técnicas simples para conservar bacterias de dicho origen, con vistas a disponer de información actualizada sobre la factibilidad de su utilización en laboratorios de recursos limitados, que requieren mantener este tipo de microorganismos. Este trabajo presenta los resultados sobre la preservación de cepas de *Shigella* spp. mantenidas por la técnica alternativa de secado en perlas de vidrio.

MÉTODOS

Se seleccionaron dos cepas bacterianas (tabla 1) de *Shigella* spp. que forman parte de la CCINHEM, conservadas acorde con el procedimiento descrito por Malik⁷ para la técnica de secado en perlas de vidrio, durante cuatro años.

Tabla 1. Microorganismos de ensayo. Colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, 2011

Cepas de trabajo	Procedencia	Origen	Código CCINHEM
<i>Shigella flexneri</i> 12022	ATCC	No documentado	3013
<i>Shigella</i> spp. B 851	HPCH	Coprocultivo	300X

ATCC: American Type Culture Collection; HPCH: Hospital Pediátrico Centro Habana.

El control de la viabilidad de las cepas se realizó a diferentes tiempos ($T_0 = 24$ horas, $T_1 = 7$ días, $T_2 = 30$ días, $T_3 = 90$ días, $T_4 = 6$ meses, $T_5 = 1$ año, $T_6 = 2$ años, $T_7 = 3$ años, $T_8 = 4$ años) y de cada tubo de trabajo conservado en refrigeración fue extraída una perla de vidrio con la ayuda de una pinza estéril (por flameo), la que se depositó en caldo cerebro corazón (BIOCEN) con 1 % de extracto de levadura (BIOCEN), y se incubó a 35 ± 2 °C durante 18 a 24 horas.

A partir de los caldos crecidos fueron realizados los controles de viabilidad por la técnica de Miles y Misra modificada,^{11,12} para los que se utilizó el medio sólido agar nutriente (AN) de producción nacional (BIOCEN) y se realizó el conteo de células viables por duplicado, la comprobación de pureza y morfología microscópica (con el empleo de la Tinción de Gram),^{13,14} y la verificación de las características bioquímicas (por el método convencional de los tubos de ensayo), siguiendo las recomendaciones de Cowan y Steel¹⁵ y Andrews y Jacobson.¹⁶

Para el análisis de los datos de ensayo se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para comparar las medias del recobrado de las células viables (UFC/mL) con respecto a las variables: tiempo de conservación, dilución y preservante. Se empleó el análisis de la varianza (ANOVA), docimando las hipótesis con un nivel de significación (α) de 0,05. Se probaron las hipótesis de interacción de tercer y segundo orden. Se evaluaron los efectos de la variable no involucrada en la interacción para cada una de las categorías del tiempo.

Los estudios de discriminación de las medias que resultaron diferentes fueron realizados mediante el *test* de Scheffé de comparaciones múltiples *post hoc* con un nivel de significación (α) de 0,05.

Se consideró como variable dependiente la recuperación de células viables, expresada en UFC/mL y como variables independientes, el tiempo de conservación con seis niveles, dilución con ocho niveles y mezclas preservantes con nueve niveles.

La prueba de contraste de Kolmogorov-Smirnov fue utilizada para comprobar la distribución normal de los datos y la prueba de Levene para comprobar la homocedasticidad de la varianza.

En el caso de no cumplirse los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las varianzas, se aplicó el estadígrafo F de Fisher por ser robusto cuando el tamaño muestral es grande para el incumplimiento de la normalidad ($N > 30$), y los subgrupos tienen aproximadamente los mismos tamaños para el incumplimiento de la homogeneidad de varianzas.

Para determinar si el valor medio de UFC/mL entre *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Shigella* spp. B 851 era el mismo, se aplicó una prueba t de student para muestras independientes, tomando como valor crítico 0,05.

RESULTADOS

A los cuatro años de conservación de las cepas de *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Shigella* spp. B 851 se comprobó que se mantuvieron viables, y que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de las medias de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) recuperadas para ambos cultivos (tabla 2).

Tabla 2. Comparación de las medias entre las cepas en estudio. Colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, 2011

Variable	Cepas	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media
UFC/mL	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	1971	33,60	33,300	0,750
	<i>Shigella</i> spp. B 851	1974	34,39	33,222	0,748

Prueba de Levene: $p = 0,853$.
 $t = -0,752$; $p = 0,452$.

Al ser el nivel de significación de la prueba de Levene mayor que 0,05 no se rechazó la hipótesis de igualdad de las varianzas ni tampoco la de igualdad de medias de los valores de recuperación de las células viables, expresada en UFC/mL para las cepas en cuestión, ya que el nivel crítico de contraste fue superior a 0,05.

Con referencia a los resultados de la comparación de las medias entre los factores preservante, tiempo de conservación y dilución, no existieron interacciones de tercer orden, o sea, interacción conjunta para los tres factores, así como no se detectó interacción de segundo orden del tipo preservante-dilución. Además, para el factor tiempo de conservación no fue posible realizar este análisis, pues tiene efecto conjunto sobre la recuperación de los cultivos expresados en UFC con estas variables (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las medias de UFC/mL según preservante, dilución, y tiempo de conservación. Colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, 2011

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	2786308,859(a)	655	4253,907	8,875	0,000
Intersección	3527348,995	1	3527348,995	7359,062	0,000
Preservante	18550,893	8	2318,862	4,838	0,000
Dilución	1737731,331	7	248247,333	517,915	0,000
Tiempo	214731,290	8	26841,411	55,999	0,000
Preservante Dilución	14016,724	56	250,299	0,522	0,999
Preservante Tiempo	94254,639	64	1472,729	3,073	0,000
Dilución Tiempo	133397,557	56	2382,099	4,970	0,000
Preservante Dilución Tiempo	88710,329	448	198,014	0,413	1,000
Error	1576485,092	3289	479,320	-	-
Total	8922262,000	3945	-	-	-
Total corregida	4362793,950	3944	-	-	-

gl: grados de libertad; F: estadígrafo F de Fischer; (a): R cuadrado = 0,639 (R cuadrado corregida = 0,567).

Para cada nivel del tiempo de conservación evaluado se analizaron los efectos de las variables dilución-preservante mediante la ejecución de un ANOVA de dos vías, de donde se obtuvo que:

- A las 24 horas de haber mantenido las cepas de ensayo a temperatura de refrigeración es apreciable la acción conjunta dilución - preservante, pero no pueden delimitarse el efecto que provocan estas variables sobre la variable dependiente, expresada en UFC/mL.
- En los subsiguientes tiempos de conservación ensayados desde los 21 días hasta los 4 años no se detectaron interacciones dilución - preservante, aunque sí se encontraron diferencias significativas entre las diluciones, pero no para las mezclas preservantes en este estudio.
- A partir del año de haberse preservado las cepas de *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Shigella* spp. B 851 por este método se detectó interacción dilución - preservante, y no se pudo delimitar los efectos principales de cada factor sobre el recobrado de células viables expresado en UFC/mL.

En general, se encontraron diferencias significativas en relación con las diluciones, pero no existen evidencias suficientes para demostrar diferencias significativas entre las mezclas preservantes ensayadas, lo que hace pensar que el efecto protector que ofrecen dichas mezclas es similar (Fig.).

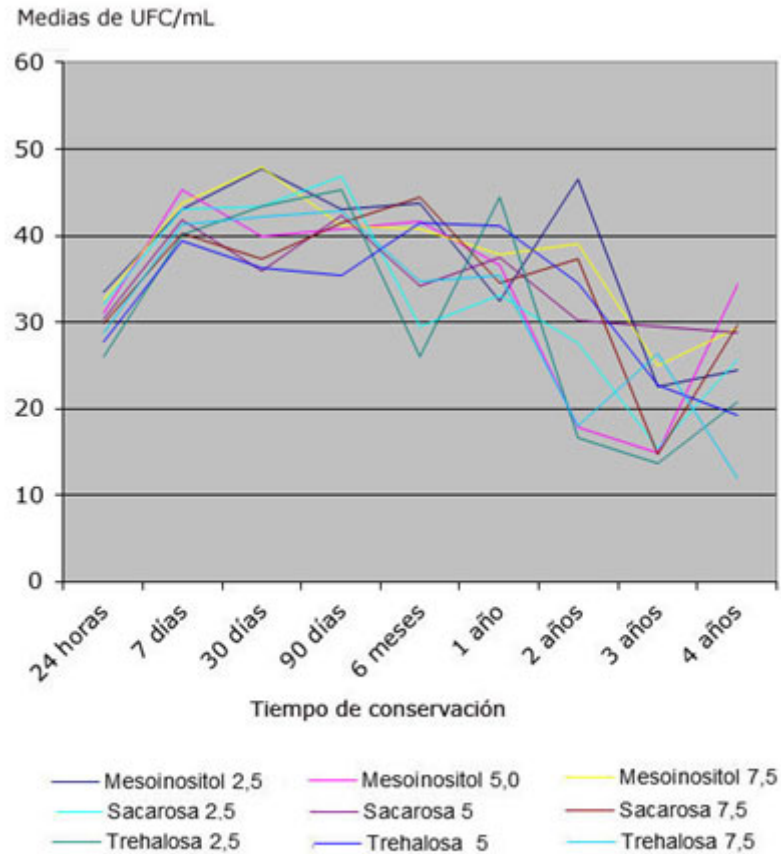


Fig. Medias de las UFC según tiempo de conservación y preservantes.

Al realizar la comprobación de la morfología microscópica de ambos cultivos y la pureza, mediante la Tinción de Gram, se obtuvo el resultado esperado: ambas cepas resultaron cultivos puros de bacilos gramnegativos.

En relación con los resultados del chequeo fenotípico realizado a las cepas de *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Shigella* spp. B 851 durante el tiempo de estudio, las tablas 4 y 5 muestran los datos para las pruebas chequeadas (ocho), donde se obtuvo variabilidad en las respuestas correspondientes a la fermentación de los azúcares dulcitol y manitol, respectivamente, en ambos cultivos. A esto se añade que la respuesta de la prueba de Indol resultó diferente, al menos en una oportunidad, para la cepa *Shigella* spp. B 851 en dos de las mezclas preservantes utilizadas.

Tabla 4. Resultados de la verificación fenotípica de la cepa *Shigella flexneri* ATCC 12022. Colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, 2011

Mezclas preservantes	Pruebas bioquímicas										
	Oxi	Lys	Indol	Mov	Cit	Mtol	Dul	Kligler (9/9)			
								Glu	Lac	Gas	H ₂ S
SK + Meso 2,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-
SK + Meso 5,0 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 8/9	- 5/9	+	-	-	-
SK + Meso 7,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 5/9	+	-	-	-
SK + Sac 2,5%	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 4/9	- 5/9	+	-	-	-
SK + Sac 5,0 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 8/9	- 4/9	+	-	-	-
SK + Sac 7,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 8/9	- 5/9	+	-	-	-
Sk + Treh 2,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-
Sk + Treh 5,0 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-
Sk + Treh 7,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 8/9	+	-	-	-

Sk: leche descremada; Sac: sacarosa; Meso: mesoinositol; Treh: trehalosa; Oxi: prueba de la oxidasa; Lys: descarboxilación de lisina; Mov: movilidad; Cit: utilización del agar Citrato de Simmons; Mtol: fermentación de Manitol; Dul: fermentación de dulcitol; Glu: fermentación de glucosa; Lac: fermentación de lactosa; H₂S: producción de sulfuro de hidrógeno.

Tabla 5. Resultados de la verificación fenotípica de la cepa *Shigella* spp. B 851. Colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, 2011

Mezclas	Pruebas bioquímicas										
	Oxi	Lys	Indol	Mov	Cit	Mtol	Dul	Kligler (9/9)			
								Glu	Lac	Gas	H ₂ S
SK + Meso 2,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-
SK + Meso 5,0 %	- 9/9	- 9/9	- 5/9	- 9/6	- 9/9	+ 9/9	- 8/9	+	-	-	-
SK + Meso 7,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 8/9	+	-	-	-
SK + Sac 2,5%	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-
SK + Sac 5,0 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 8/9	- 7/9	+	-	-	-
SK + Sac 7,5 %	- 9/9	- 9/9	- 8/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-
Sk + Treh 2,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-
Sk + Treh 5,0 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-
Sk + Treh 7,5 %	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	- 9/9	+ 9/9	- 9/9	+	-	-	-

Sk: leche descremada; Sac: sacarosa; Meso: mesoinositol; Treh: trehalosa; Oxi: prueba de la oxidasa; Lys: descarboxilación de lisina; Mov: movilidad; Cit: utilización del agar Citrato de Simmons; Mtol: fermentación de Manitol; Dul: fermentación de dulcitol; Glu: fermentación de glucosa; Lac: fermentación de lactosa; H₂S: producción de sulfuro de hidrógeno.

DISCUSIÓN

La evaluación del método de secado en perlas de vidrio resulta interesante, ya que pocos artículos han documentado su utilidad en la conservación de bacterias, y lo han hecho únicamente para hongos,^{1,7,8} a pesar de estar reconocida su utilidad como método simple para mantener dichos cultivos, que es aplicable en aquellas áreas o laboratorios donde los recursos no sean muy abundantes. Dentro de sus ventajas están el tener un protocolo de ejecución muy sencillo, la utilidad de pocos materiales y las misceláneas para su ensayo, así como los requerimientos de poco espacio para el almacenamiento.

Se destaca entre los resultados encontrados la similitud que parecen tener las mezclas preservantes de sacarosa, mesoinositol y trehalosa, evaluadas en lo que a efecto protector ofrecen frente a la desecación, evidenciado por el análisis estadístico. No fue así el comportamiento que se muestra en la figura, donde los valores de las medias de la recuperación de células viables, expresadas en UFC/mL, oscilan entre 35 y 50. También se aprecia que durante los primeros cuatro a cinco meses de ensayo no hay casi diferencias en el efecto protector de las mezclas. Es a partir de los seis meses que se aprecia una disminución del efecto de las mezclas,

las que ofrecen variabilidad en su protección, la cual va disminuyendo a medida que avanza el tiempo de experimentación.

En este ensayo se comprobó que la utilización del mesoinositol al 5,0 %, concentración a la cual se recomienda su uso en la literatura de consulta,^{1,7} resultó adecuado para preservar las cepas de *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Shigella spp.* B 851 de manera que éstas se mantuviesen viables, puras y estables para las propiedades fisiológicas evaluadas al menos durante el primer año, hecho que sustenta la afirmación de poseer buena actividad preservante, y en este caso el resultado obtenido fue el esperado.

La acción protectora que ejercen los azúcares ensayados puede relacionarse con la facilidad con que se combinan con el resto de los componentes del medio suspensor, a causa de su estructura, lo que le permite una solubilidad notable por la presencia de grupos OH, así como las interacciones que establecen a nivel estructural, fisiológico y molecular. Disacáridos como la sacarosa y la trehalosa se emplean comúnmente como crioprotectores en el mantenimiento de cepas por congelación,^{17,18} pero solo algunos autores han explicitado su utilidad como agentes protectores frente a la desecación.^{19,20}

Este estudio sugiere que puedan utilizarse estas mezclas para conservar las cepas de ensayo, que son lábiles al menos por seis meses, y que puede esperarse otro comportamiento para microorganismos más resistentes, ensayo que debe ser realizado para evaluar la factibilidad del empleo de estas mezclas soporte para mantener otros grupos bacterianos, con vistas a dilucidar cuál de ellas o cuáles pudieran ser las de mayor efectividad, lo que garantiza la importancia en el mantenimiento de las propiedades de los cultivos que los hacen importantes.

Por su parte, la variabilidad obtenida en las pruebas de indol, dulcitol y manitol es un comportamiento que ya ha sido descrito en este trabajo,^{15,16} donde se reportan como características bioquímicas inusuales que comparten algunos biotipos de *Shigella flexneri*, las que han de diferenciarse necesariamente, con ayuda de la serología, para completar su caracterización. Estos resultados confirman que cada cepa es única y su estudio debe ser lo más abarcador posible antes de identificarla hasta el nivel de especie, razón por la cual se prefirió nombrar hasta el nivel de género el cultivo *Shigella spp.* B851 durante su caracterización inicial, y solo se definió como perteneciente al género de *Shigella spp.*, al no disponer de la batería adecuada de antisueros para realizar un estudio completo.

Se concluye que la técnica de secado en perlas de vidrio resulta apropiada para el mantenimiento de las bacterias ensayadas en un plazo limitado de tiempo, pero dada su sencillez, bajo costo y efectividad, es una alternativa factible de utilizar en los laboratorios sanitarios de recursos limitados para la conservación de las cepas utilizadas con fines investigativos, docentes y en los servicios científico-técnicos, siempre y cuando se garantice la disponibilidad de una réplica de estas por otro método de preservación.

RECOMENDACIONES

Evaluar otros grupos de bacterias para determinar utilidad de esta técnica simple en la conservación de estos materiales biológicos de trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Rev Argent Microbiol. 1998;30:42-51.
2. Weng Z, Díaz OE, Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2005 [citado 5 de mayo de 2011];43(3). Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000300006&lng=es
3. Smith D, Green P, Day G. Management and maintenance of culture collections. Egham: United Kingdom Federation of Culture Collection; 2000.
4. García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM. 2000;30:12-6.
5. World Federation of Culture Collection. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms [Internet]. Japan: WFCC Executive Board; 2010 [cited 5 May 2011]. Available from:
<http://www.wfcc.info/guidelines/>
6. Giono S, Castro G, Aguilar G, Arteaga RI, Ochoa SA, Rivera M, et.al. Manual de prácticas. En: V Seminario y Taller Internacional de Colecciones Microbianas. México DF: Instituto Politécnico Nacional - Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2009.
7. Malik KA. Maintenance of microorganisms by simple methods. In: Kirsop BE. & Doyle A, eds. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. London: Academic Press; 1991. p.121-32.
8. Smith D, Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. Walling Ford: CAB International; 1994.
9. Weng Z. Colección de Cultivos del INHEM: conservación de bacterias de interés sanitario con fines docente e investigativo [Tesis para optar por el Título de Master en Salud Ambiental]. La Habana: Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología; 2008.
10. Weng Z, Junco RA, Díaz OE. Colección de cultivos microbianos: Apuntes sobre su desarrollo. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2003 [citado 25 de octubre de 2011];41(1). Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032003000100009&lng=es
11. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg (London) 1938;38(6):732-49.
12. Alonso LX, Poveda JA. Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm TM 3M TM para el análisis de alimentos [tesis en Internet]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 2008 [citado 25 de octubre de 2011]. Disponible en:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>

13. Goldman E, Green LH, editors. Practical Handbook of Microbiology. Taylor & Francis Group; 2008.
14. Zuazo JL. Microscopia y coloraciones. En: Llop A, Valdés-Dapena, MM, Zuazo JL. Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana: ECIMED; 2001. p. 19-28.
15. Barrow GI, Feltham RKA, editors. Cowan and Steel's Manual for the identification of Medical Bacteria. Cambridge: University Press; 1999.
16. Andrews WH, Jacobson A. *Shigella*. In: Jackson A, ed. Bacteriological Analytical Manual. Washington: AOAC; 1998.
17. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. J Appl Microbiol. 2003; 94:947-52.
18. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon Thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. Biotechnol Prog. 2004;20:248-54.
19. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol Rev. 1994;58(4):755-805.
20. Billi D, Wright DJ, Helm RF, Prickett T, Potts M, Crowe JH. Engineering Desiccation Tolerance in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2000;66:1680-4.

Recibido: 29 de diciembre de 2011.

Aprobado: 8 de diciembre de 2012.

MSc. *Zulia Weng Alemán*. Departamento de Microbiología Sanitaria. Laboratorio Colección Microbiana. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Infanta 1158 e/ Llinás y Clavel, Centro Habana. La Habana, Cuba. CP: 10300. Correo electrónico: zuliaweng@yahoo.com