

***Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.* de origen alimentario y su conservación en agua destilada**

***Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus spp.* of food origin and its conservation in distilled water**

Zulia Weng Alemán^I; Geominia Maldonado Cantillo^{II}; Raquel de los Ángeles Junco Díaz^{III}; Sofía Flavia Borrego Alonso^{IV}; Inalvis Álvarez Molina^V; Zuleidys Hechavarría Aguiar^{VI}; Nélide María Hernández Perera^{VII}

^I Máster en Salud Ambiental. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Profesora Auxiliar e Investigadora Agregada. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba.

^{II} Máster en Salud Ambiental. Doctora en Medicina. Especialista en Bioestadística. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba.

^{III} Máster en Salud Ambiental. Especialista de II Grado en Microbiología e Higiene y Epidemiología. Doctora en Medicina. Profesora e Investigadora Auxiliar. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba.

^{IV} Doctora en Ciencias Biológicas. Archivo Nacional de Cuba. La Habana, Cuba.

^V Licenciada en Tecnología de la Salud en la especialidad de Microbiología. Hospital Docente Infantil "William Soler". La Habana, Cuba.

^{VI} Licenciada en Tecnología de la Salud en la especialidad de Microbiología. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba.

^{VII} Técnico A de Laboratorio Sanitario. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El agua destilada ha sido utilizada como medio de soporte para preservar cepas fúngicas, fundamentalmente por existir poca información sobre sus beneficios para mantener otros microorganismos. Con esta premisa, se decidió evaluar su utilidad para conservar bacterias, de origen alimentario, en la colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.

MÉTODOS: Un total de 12 cepas (seis pertenecientes a *Pseudomonas spp.* y seis a *Staphylococcus spp.*) fueron ensayadas. Los datos de viabilidad obtenidos durante el año de conservación fueron procesados con el paquete estadístico SPSS versión 11.5. El análisis estadístico incluyó el análisis de la varianza para la comparación de las medias del recobrado de viables para las variables tiempo de conservación y dilución, 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 los grupos microbianos conservados en agua destilada. Los factores tiempo de conservación y dilución ejercieron su influencia sobre el recobrado de los cultivos. Se obtuvo estabilidad en la recuperación de viables a partir de los siete días de estudio. Se manifestaron diferencias significativas respecto a las diluciones de mayor valor. Se obtuvo 100 % de estabilidad en las características fisiológicas y en la respuesta a la tinción de Gram para todas las cepas.

CONCLUSIONES: La conservación en agua destilada resulta adecuada para preservar las cepas de *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp. aisladas de muestras de alimentos durante un año con una buena viabilidad.

Palabras clave: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, agua destilada, conservación.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The distilled water has been used as a support means to preserve fungal strains, mainly due to lack of information on its benefits to maintain other microorganisms. Thus, authors assessed its usefulness to preserve bacteria of food origin in the collection of microbial cultures in the National Institute of Hygiene, Epidemiology and Microbiology.

METHODS: A total of 12 strains (six from *Pseudomonas* spp and six from *Staphylococcus* spp) were assayed. Data on viability obtained during the year of conservation were processed using the SPSS statistical package version 11.5. The statistical analysis included that of variance to compare the means of recovery of viable for the following variables: time of conservation and dilution, the Scheffé's test of post hoc multiples comparisons for discrimination of means. The physiological characteristics and the response to Gram's tincture of strains were controlled.

RESULTS: There were not significant differences among microbial groups conserved in distilled water. The factors time of conservation and dilution had influence on the recovery of the cultures. There was a good stability in vials recovery from the 7 study days. There were significant differences regarding the dilutions of a greater value. It was possible to obtain a 100% of stability in the physiological characteristics and in the response to Gram's tincture for all the strains.

CONCLUSIONS: The conservation in distilled water is appropriate to preserve the strains of *Pseudomonas* spp and of *Staphylococcus* spp isolated from samples of foods during a year achieving a good viability.

Key words: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, distilled water, conservation.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son elementos básicos de ciencias, como la microbiología y la biología celular, a la par que constituyen herramientas de investigación, y son determinantes en la resolución de problemas ambientales, en la salud humana y como fuentes de materiales esenciales para uso industrial, médico y biotecnológico,

entre otros. Su uso creciente ha reforzado la necesidad de conservarlos, de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables.

Con frecuencia la conservación a largo plazo de cultivos microbianos en los laboratorios se dificulta, en especial por el elevado costo del equipamiento que se requiere para este fin. Sin embargo, el mantenimiento mediante el empleo de métodos simples es posible en la mayoría de ellos. Dichos métodos, al igual que las técnicas de elección de congelación y liofilización, deben garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación.¹⁻³

Un rango variable de técnicas que oscilan desde los métodos de crecimiento continuo hasta aquellas que reducen el metabolismo, se encuentran disponibles. Entre ellas, se destaca la conservación en agua destilada.¹⁻⁵ Técnica alternativa de amplia aplicación y que es reconocida entre los curadores, como el método de *Castellani*, al ser este autor el primero en documentar su utilidad para preservar hongos patógenos.^{6,7} Otros autores han publicado resultados que avalan la obtención de altos porcentajes de viabilidad y buena estabilidad de las propiedades morfofisiológicas en hongos filamentosos, levaduras y algunas bacterias.^{2,8-11}

Acorde con las líneas de trabajo de la colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CCINHEM), se decidió evaluar la utilidad del método de conservación en agua destilada para preservar bacterias, de origen alimentario, en nuestro laboratorio, y ese el objetivo de este trabajo.

MÉTODOS

Microorganismos de ensayo: se utilizaron réplicas de cultivos aislados de muestras de alimentos en el Departamento de Microbiología de los Alimentos del Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA), pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp., así como de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, siglas en inglés), estos últimos como cepas de control (tabla 1).

Medio soporte: para el montaje de la técnica se utilizó agua destilada estéril (121 °C por 15 minutos), distribuida en los frascos de conservación, de 20 mL de capacidad, a razón de 9 mL/frasco.

Para la evaluación de la técnica de conservación en agua destilada se empleó un diseño experimental de bloques al azar, para lo cual se prepararon tres bloques del ensayo durante el estudio. El procedimiento de trabajo se ejecutó según el reporte de *Liao y Shollenberger*.¹² Durante el año de ensayo, a cada una de las réplicas de las cepas conservadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz se les ejecutó el control de la viabilidad a diversos tiempos (T_0 = en el momento de la conservación, T_1 =7 días, T_2 =1 mes, T_3 =3 meses, T_4 =6 meses, T_5 =1 año), para lo que se utilizó caldo cerebro corazón con 1 % de extracto de levadura (Biocen), que se incubó a 35 ± 2 °C durante 18 a 24 horas.

Tabla 1. Microorganismos de ensayo. CCINHEM, 2007-2008

Cepas de trabajo	Procedencia	Origen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	ATCC	No documentado
<i>Pseudomonas</i> spp. 1668	INHA	Ensalada fría
<i>Pseudomonas</i> spp. 1674	INHA	Pescado
<i>Pseudomonas</i> spp. 1059	INHA	Pollo en salsa
<i>Pseudomonas</i> spp. 1622	INHA	Carne estofada
<i>Pseudomonas</i> spp. 1146-8	INHA	Lomo especial ahumado
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	ATCC	No documentado
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	ATCC	Aislado clínico
<i>Staphylococcus</i> spp. 909	INHA	Cake
<i>Staphylococcus</i> spp. 1633	INHA	Polen
<i>Staphylococcus</i> spp. 1984	INHA	Arroz frito
<i>Staphylococcus</i> spp. 1672	INHA	Atún desmenuzado

ATCC: *American Type Culture Collection*; INHA: Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

Fuente: Registro de cepas. CCINHEM, 2008.

A partir del crecimiento en caldo cerebro corazón fueron realizados los controles de viabilidad, por la técnica de Miles y Misra modificada,¹³ para los que se utilizó el medio sólido agar nutriente (AN, Biocen) y se realizó el conteo de células viables por duplicado; la comprobación de pureza y morfología microscópica [empleando la Tinción de Gram¹⁴] y la verificación de las propiedades bioquímicas [por el método convencional de los tubos de ensayo], siguiendo las recomendaciones internacionales.¹⁵⁻¹⁸ Todos los aspectos evaluados formaron parte del control de viabilidad de los cultivos, y se ejecutaron en los tiempos señalados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la curva de sobrevivientes y se graficó para cada intervalo de tiempo el resultado obtenido, expresado en logaritmo, del cociente entre los valores medios de UFC/mL después de la conservación respecto al valor medio de las UFC/mL obtenido a T₀ (momento inicial del ensayo) multiplicado por 100.

Para el análisis de los datos de ensayo se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.5. Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para comparar las medias del recobrado de las células viables (UFC/mL) para las diferentes diluciones y el tiempo de conservación ensayado. Los valores de probabilidad de error tipo I inferiores a 0,05 fueron considerados significativos.

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 variable independiente el tiempo de conservación y dilución. 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.

Para determinar si los valores medios de UFC/mL de *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp. eran iguales, se aplicó una prueba t de Student para muestras independientes, y se tomó como valor crítico 0,05.

RESULTADOS

Después de un año de almacenamiento en agua destilada, ambos grupos de microorganismos (*Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp.) permanecieron viables y pudieron recobrase en su totalidad en medio agarizado con una pérdida de viabilidad ligeramente marcada para el género *Staphylococcus* spp. De manera general el comportamiento de ambos grupos microbianos fue similar (fig.).

Al realizar el análisis estadístico, se encontraron diferencias no significativas entre los grupos en la comparación de las varianzas y de las medias (tabla 2), lo que demuestra que el método de conservación ensayado es aplicable para cada grupo bacteriano indistintamente, al menos para el período evaluado.

Como el nivel de significación de la prueba de Levene es menor que 0,05 se rechaza la hipótesis de igualdad de las varianzas. No existieron evidencias estadísticas suficientes para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de los valores de recobrado de viables, expresada en UFC/mL en los dos grupos en estudio, *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp., pues el nivel crítico de contraste es mayor a 0,05. Por su parte, al analizar los resultados del ANOVA se obtuvo que sí existe interacción entre los factores tiempo de conservación y diluciones sobre la viabilidad de los cultivos, por lo que se realizó un ANOVA de una vía para cada factor.

En la tabla 3 se muestra la comparación de medias para el grupo *Pseudomonas* spp., donde se observaron diferencias significativas para el recobrado de células viables expresado en UFC/mL a los diferentes tiempos, lo que evidencia que el factor tiempo ejerce su influencia sobre la viabilidad de estos cultivos. En relación con el tiempo inicial de conservación (T_0) se apreciaron diferencias significativas en todos los tiempos ensayados, mientras que, a partir de los siete días, se observó estabilidad en el recobrado de los cultivos en experimentación. Cuando se analizó el efecto del factor dilución, se apreció que este ejerce una acción sobre la recuperación de células viables vinculado con el valor de p (0,000) y el estadígrafo F, que es menor de 0,05. Esto indica que la recuperación promedio de células viables es significativamente diferente con las diluciones, y se manifiestan dichas diferencias en las mayores diluciones.

Porcentaje de sobrevivientes (Log UFC/mL)

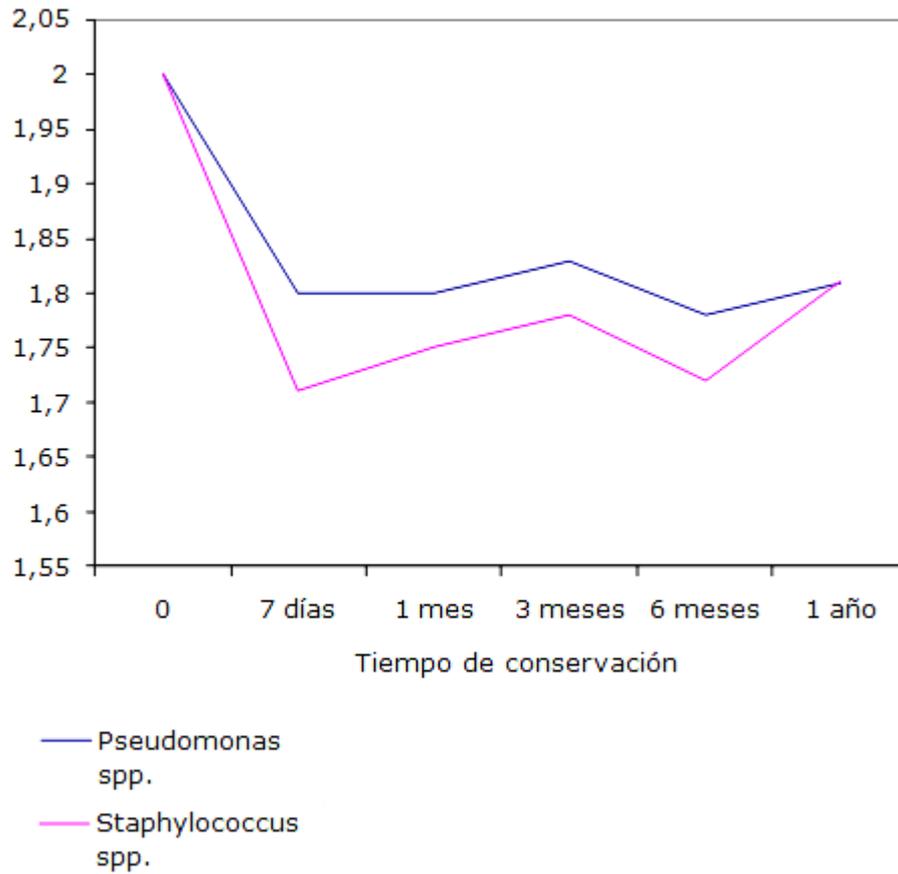


Fig. Cambios en la población celular de *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp. durante el tiempo de ensayo.

Tabla 2. Comparación de las medias entre los grupos de microorganismos en ensayo. CCINHEM, 2007-2008

Grupos bacterianos	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media
<i>Pseudomonas</i> spp.	283	48,72	30,426	1,809
<i>Staphylococcus</i> spp.	289	45,08	32,212	1,895

Prueba de Levene: $p=0,003$.

$t=1,391$; $p=0,165$.

N: Tamaño muestral.

Fuente: Resultados del estudio realizado. CCINHEM, 2007-2008.

Tabla 3. Comparación de las medias en *Pseudomonas* spp. para los factores en estudio. CCINHEM, 2007-2008

Factor tiempo de conservación					
Media	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intergrupos	23624,898	5	4724,980	5,512	0,000
Intragrupos	237439,604	277	857,183		
Total	261064,502	282			
Factor dilución					
Media	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intergrupos	192132,670	7	27447,524	109,500	0,000
Intragrupos	68931,832	275	250,661		
Total	261064,502	282			

gl: grados de libertad; F: estadígrafo de Fischer; Sig: significación estadística.
 Fuente: Resultados del estudio realizado. CCINHEM, 2008.

En el grupo *Staphylococcus* spp., el factor tiempo de conservación también afectó la viabilidad de los cultivos, lo que quedó demostrado con el valor de p, que fue menor que 0,05. Respecto al tiempo inicial de conservación (T_0), se evidenció un comportamiento similar al manifestado por las cepas de *Pseudomonas* spp. en lo que a estabilidad de las células viables de las cepas en estudio se refiere. Igualmente, para el factor dilución se observó que este ejerce influencia en la recuperación de las cepas, y se destaca el hecho de que la viabilidad de las células fue significativamente diferente a las diluciones, donde se identificó que para las diluciones mayores (10^{-7} y 10^{-8}) se encontraron diferencias significativas, mientras que las primeras diluciones tienen un similar comportamiento, o sea, siempre se pudo realizar el conteo de células viables hasta la dilución 10^{-6} (tabla 4).

Al comprobar la pureza en la totalidad de las cepas recobradas en ambos grupos bacterianos se obtuvo el 100 % de estabilidad de respuesta a la tinción de Gram; todos los cultivos de *Pseudomonas* spp. se mantuvieron libres de contaminación como cultivos puros de bacterias gramnegativas en forma de bastón, y las cepas de *Staphylococcus* spp. como cultivos puros de bacterias grampositivas agrupados en forma de racimos de uva. Las propiedades fisiológicas evaluadas para cada grupo de bacterias evidenciaron estabilidad al 100 %, durante todo el tiempo de experimentación.

Tabla 4. Comparación de las medias en *Staphylococcus* spp. para los factores en estudio. CCINHEM, 2007-2008

Factor tiempo de conservación					
Media	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intergrupos	38275,573	5	7655,115	8,315	0,000
Intragrupos	260555,596	283	920,691		
Total	298831,170	288			
Factor dilución					
Media	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intergrupos	193287,558	7	27612,508	73,516	0,000
Intragrupos	105543,611	281	375,600		
Total	298831,170	288			

gl: grados de libertad; F: estadígrafo de Fischer; Sig.: significación estadística.
 Fuente: Resultados del estudio realizado. CCINHEM, 2008.

DISCUSIÓN

La conservación en agua destilada resulta apropiada para hongos y actinomicetos, como se reporta en varias publicaciones.^{4,5,19-25} A pesar de la simplicidad de este método, la preservación de bacterias en este soporte no ha sido ampliamente adoptada en la mayoría de los laboratorios microbiológicos, y esto puede tener su causa en la carencia de la disponibilidad de datos experimentales de variados estudios que validen la fiabilidad de dicho método.

Los resultados obtenidos en este estudio, para las cepas de *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp. demuestran que el método ensayado es apropiado para conservar cepas de estos grupos microbianos, entre las cuales no fueron detectadas diferencias significativas, aún cuando cada una de ellas es un cultivo con características propias.

Las diferencias significativas encontradas entre el tiempo de conservación inicial y los primeros siete días de ensayo pueden tener su explicación en el hecho de que las células bacterianas se encontraban en fase de adaptación al proceso de ser mantenidas en agua destilada, respuesta lógica, ya que son agentes vivos que reciben influencia de disímiles factores del ambiente (temperatura, luz, entre otros). Es después de esa semana que se observó una estabilidad de las células y permaneció así para el resto del tiempo de experimentación, afirmación sustentada por los resultados del análisis estadístico de los datos, corroborando en este caso la buena actividad preservante que tiene el agua destilada, la cual ha de estar libre de contaminantes y ser de la mejor calidad.

Solo unos pocos autores han reportado la utilidad del agua como medio soporte para mantener cultivos bacterianos y, en su mayoría, estas publicaciones se refieren a la viabilidad de bacterias fitopatógenas.^{4,26-28} En un estudio realizado en el año 2003¹³ se documenta el ensayo, entre otras, para cepas patógenas humanas de *Pseudomonas aeruginosa* y otra de *Staphylococcus aureus*, respectivamente, pero solo un ejemplar de cada una.

Este experimento demuestra que para el tiempo evaluado (30 semanas) resulta ser más conveniente para conservar bacterias gramnegativas, lo que no resulta comparable con los datos obtenidos en este estudio. Esto sugiere extender este ensayo por más tiempo.

Se concluye que la técnica de conservación en agua destilada resulta adecuada para conservar las cepas de *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus* spp. durante 1 año con una buena viabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weng Z, Díaz OE, Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿que debemos conocer?. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2005 Sep [citado: 15 mayo 2006];43(3):0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000300006&lng=es
2. García López MD, Uruburu Fernández F. La conservación de cepas microbianas. Actualizado 25 septiembre 2000 [citado: 15 mayo 2006];(30):12-6. Disponible en: http://www.semico.es/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf
3. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Rev Argent Microbiol. 1998;30 (1):42-51.
4. Malik KA. Maintenance of microorganisms by simple methods. En: Kirsop BE, Doyle A, editores. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. London: Academic Press; 1991. p.121-32.
5. Borman AM, Szekely A, Campbell CK, Johnson EM. Evaluation of the Viability of Pathogenic Filamentous Fungi after Prolonged Storage in Sterile Water and Review of Recent Published Studies on Storage Methods [Internet]. 2006 [cited: 21 December 2010];161(6):361-8. Disponible en: <http://hinari.gw.who.int/whalecomwww.springerlink.com/whalecom0/content/k5203429280420nj/fulltext.pdf>
6. Castellani A. The Viability of Some Pathogenic Fungi in Sterile Distilled Water. J Trop Med Hyg. 1939;42: 225.
7. Castellani A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. Mycopathol Mycol Appl [Internet]. 31 August 1963 [cited: 21 December 2010];20:1-6. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/u42768216503711q/fulltext.pdf>

8. McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiol.* 1974;28(2):218-222.
9. Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Fungi preservation in distilled water. *An Bras Dermatol.* 2005;80(6):591-4.
10. Murillo P, Cunha de Oliveira P. Preservação de dermatófitos pela técnica água destilada estéril. *RBAC.* 2008;40(3):167-9.
11. Odds FC. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. *J Med Veter Mycol.* 1991;29: 413M-15.
12. Liao CH, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and phosphate-buffered saline. *Lett Appl Microbiol* 2003; 37(1):45-50. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x/pdf>
13. Weng Alemán Z, Iglesias Hernández B, Abreu Orta M, Beltrán Díaz JR. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet]. 2004 Abril [citado: 2 noviembre 2010];42(1):0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156130032004000100004&lng=es
14. Zuazo JL. Microscopía y coloraciones. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL. *Microbiología y Parasitología Médicas.* La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2001:19-28.
15. Barrow GI, Feltham RKA, editors. Characters of gram positive bacteria. En: Cowan and Steel's *Manual for the identification of Medical Bacteria.* 3rd. ed. Cambridge: University Press; 1999. p. 50-90.
16. De Paulis A, Pedrari SC, Chazarreta C, Santoianni JE. Five-Test Simple Scheme for Species-Level Identification of Clinically Significant Coagulase-Negative Staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2003;41(3):1219-24. Disponible en: <http://jcm.asm.org/cgi/content/full/41/3/1219>
17. Martínez AM, Pérez JI, Pérez MF. *Pseudomonas.* En: Llop A., Valdés-Dapena MM, Zuazo JL. *Microbiología y Parasitología Médicas.* La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2001. p. 302-11.
18. Prieto M. Bacilos Gram negativos no fermentadores [monografía en Internet]. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2006. Disponible en: http://www.aam.org.ar/actividades/T2_3.pdf
19. Panizo MM, Reviakina V, Montes W. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev Soc Ven Microbiol* [Internet]. 2005 enero [citado: 27 abril 2009];25(1). p. 35-40. Disponible en URL: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100007&lng=es&nrm=iso
20. Ferreti de Lima R, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18:191-6. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2001-18/191196.pdf>

21. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. Rev Iberoam Micol. 1998;15:166-68. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/1998-15/166168.pdf>
22. Burdsall HH, Dorworth EB. Preserving cultures of wood decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. Mycologia. 1994;86(2):275-80. Disponible en: <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1994/burds94a.pdf>
23. Rodrigues EG, Lirio VS, Lacaz C da S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1992;34(2):159-65. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v34n2/a12v34n2.pdf>
24. Hartung de Capriles C, Mata-Essayag S. Mantenimiento de actinomicetos con el método de Castellani. Bol Soc Ven Microbiol. 1990;10(1):3-4.
25. Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. J Trop Med Hyg. 1967;70:181-4.
26. Pérez J, Casa M, Beltrán C. Conservación de bacterias por el método de suspensión de agua destilada estéril. Revista Ciencias.Com [Internet]. 2006 dic. [citado 27 Abril 2009]. p. 0-0. Disponible en URL: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEyypuAkVkZbgsuuRu.php>
27. Iacobellis NS, DeVay JE. Long term storage of plant pathogenic bacteria in sterile distilled water. App Environm Microbiol. 1986;52(2):388-9. Disponible en: <http://www.unibas.it/utenti/iacobellis/pubblcazioni%20pdf/rivista%20internazionale/Iacobellis%20and%20DeVay,%201986.pdf>
28. Wakimoto S, Utatsu I, Masuo N, Hayashi N. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. Tokio: Ann Phytopath Soc. 1982;48(5):620-7. Disponible en: http://ci.nii.ac.jp/els/110002742087.pdf?id=ART0003033207&type=pdf&lang=en&host=cinii&order_no=&ppv_type=0&lang_sw=&no=1288726260&cp

Recibido: 20 de octubre de 2010.

Aprobado: 5 de diciembre de 2010.

MSc. *Zulia Weng Alemán*. Departamento de Microbiología Sanitaria. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Infanta 1158 e/ Llinás y Clavel. Centro Habana, 10300. La Habana, Cuba. Telef.: 8705531-33 ext. 143. Fax: 537-8637320. Correo electrónico: ccm@inhem.sld.cu; weng@infomed.sld.cu