

Evaluación de una formulación para la conservación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Nancy Burguet-Lago, Nelson Sierra-Prado, Miguel Acosta Estrada

Especialista del Dpto. de I+D de Laboratorios Liorad. Ave. 27 A No. 26402 e/ 264 y 268. San Agustín. La Lisa. La Habana. Cuba. 271-78-99 Ext.126 nburguet@liorad.aica.cu

Recibido: 6 de marzo de 2013.

Aceptado: 14 de noviembre de 2013.

Palabras clave: cultivos microbianos, preservación, liofilización, viabilidad, pureza

Key words: microbial cultures, preservation, freeze-drying, viability, purity.

RESUMEN. La humanidad tiene la responsabilidad histórica de solucionar uno de los problemas más importantes de los tiempos actuales: la conservación del medio ambiente. Mientras que la conservación de plantas y animales ha sido aceptada desde hace tiempo, solo recientemente es que ha sido recibido reconocida la necesidad de conservar la diversidad microbiana. Laboratorios LIORAD dispone de una colección de cultivos microbianos procedente de subcultivos primarios de cepas de referencia, donde se encontraba depositada *Pseudomonas aeruginosa*, conservada por liofilización mediante dos variantes de sustancias lioprotectoras: leche descremada y glicerol al 20 %. Teniendo en cuenta que en la actualidad está más extendido el empleo de mezclas de aditivos, en el presente estudio se propuso como objetivo evaluar una formulación (variante 3) constituida por leche descremada más peptona al 5 %, la cual se seleccionó (a partir de estudios previos publicados por otros autores). Para verificar la conservación del cultivo se realizó un adecuado control de calidad, que incluyó la comprobación de pureza, viabilidad y estabilidad de las propiedades de interés (identificación fisiológica y bioquímica). Se procedió a realizar un tratamiento estadístico mediante el software Minitab, V 14.0, para determinar si existían diferencias significativas entre las diferentes variantes de sustancias lioprotectoras empleadas. La pureza e identidad, se mantuvieron inalterables en las tres variantes, la viabilidad: tanto en la variante 1, como en la 3 han permitido una buena supervivencia durante el tiempo objeto de estudio; no así al emplear glicerol al 20 %. El estudio estadístico corroboró con un 95 % de confiabilidad que no había diferencias estadísticas entre las variantes 1 y 3. Al finalizar el estudio se dispuso de dos variantes para la conservación de la cepa por largos periodos de tiempo (el empleo de la leche descremada al 20 % y la formulación objeto de prueba).

ABSTRACT. Humanity has the historic responsibility to solve one of the most important issues of the present time: the environment preservation. While the conservation of plants and animals has been accepted since long time ago, the need of preserving the microbial diversity has received a proper acknowledgement just recently. LIORAD Laboratories have a collection of microbiological cultures obtained from primary subcultures of reference strains, where *Pseudomonas aeruginosa* was kept freeze-dried using two variants of lipoprotection: 1. Skimmed milk and 2. Glycerol at 20 %. As currently mixtures of additives are widely used, it was evaluated as main goal of the present work a third formulation alternative: Skimmed milk plus peptone at 5 %, which was selected from previous published studies from other authors. In order to check culture preservation an adequate quality control was implemented, which included verification of purity, viability and stability of other key properties (physiological and biochemical). A statistical treatment were performed, using Minitab, V 14.0, for checking if there were significant difference between used lipoprotection variants. Purity and identity showed no variations for the three alternatives, viability in variant 1 as well as in variant three allowed a good survival during the study, which was not the case by using glycerol at 20 %. Statistical results showed there was no significant difference between these variants for 95 % confidential level. By the end of the study it was haven two variants for preserving such strain for a long period of time, the use of skimmed milk at 20 % and the formulation object of the present study.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de mantener y disponer de cultivos de calidad impuso la introducción de métodos de conservación de microorganismos a largo, mediano y corto plazos, siendo la liofilización el método de elección debido a sus numerosas ventajas, entre las que se pueden resaltar: el poder garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo (viables por 10 años o más),¹⁻⁵ conservar las propiedades de importancia de los cultivos y minimizar al máximo el riesgo de cambio genético en las células. Asimismo, reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable.⁶⁻⁹

Los aditivos o lioprotectores son sustancias que se añaden con el objetivo de mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización o el almacenamiento¹⁰ o ambos inclusive. Se conoce que los azúcares (sacarosa, trehalosa), polioles (manitol, sorbitol, inositol), algunas sales, aminoácidos (glutamato) y sustancias proteicas (peptona, leche descremada) son capaces de cumplir estos objetivos, aunque en la mayoría de los casos, los mecanismos del efecto protector son poco conocidos.¹¹⁻¹³ La composición adecuada de la formulación de sustancias lioprotectoras que se emplean durante el proceso de liofilización para la preservación de los microorganismos, es un aspecto que se debe tener presente, ser un factor que puede afectar la viabilidad de los microorganismos liofilizados.¹⁴⁻¹⁸

El microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*, registrado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con el número 9027, se emplea en esquemas de certificaciones de calidad de estricto cumplimiento en la industria biofarmacéutica.¹⁹⁻²⁰ Laboratorios LIORAD es una instalación destinada a la producción de parenterales líquidos y liofilizados; dispone de un laboratorio de control de la calidad microbiológico, donde se encuentra depositado un subcultivo primario de esta cepa de referencia. La cepa *P. aeruginosa* se encuentra conservada en caldo triptona soya (CTS) con glicerol al 20 % y en leche descremada al 20 % como sustancias lioprotectoras y la liofilización como método de conservación. De acuerdo con resultados previos del grupo de trabajo de los autores (viabilidad satisfactorias para la cepa conservada en leche descremada 20 % durante cinco años y una disminución en la viabilidad a los tres años de conservación en glicerol al 20 %),²¹ y teniendo en cuenta que en la actualidad está más extendido el empleo de mezclas de aditivos, pues en la mayoría de los casos actualmente se obtienen mejores resultados que cuando se emplean las sustancias puras,²²⁻²⁶ se propuso como objetivo de este trabajo evaluar otra variante de conservación de cepas este microorganismo (leche descremada más peptona ambas a una concentración del 5 %).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el presente trabajo se utilizó la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027 y medios de cultivos: Caldo Triptona Soya (CTS) y Agar Triptona Soya (ATS), procedentes del Centro Nacional de Biopreparados (Biocen). Se realizaron esquemas de certificaciones de calidad para su evaluación (pureza, viabilidad e identificación).²⁷⁻²⁹

Microorganismo empleado y su reconstitución

La cepa se restituyó con 1 mL de medio de cultivo CTS y se diseminó en una placa de ATS 20 µL de la suspensión del microorganismo, se incubó a (37 ± 2) °C durante 48 h.²⁴

Condiciones de cultivo y obtención de la suspensión

Del crecimiento microbiano se colectó un cuarto del césped crecido sobre la superficie de la placa de ATS, se inoculó en un erlenmeyer que contenía 100 mL de CTS y se incubó a (37 ± 2) °C en zaranda a 170 r/mín durante 1 h. El cultivo se centrifugó a 10 000 r/mín por 30 min.

Para la preparación de la suspensión, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la biomasa en CTS; se tomó 1 mL de la suspensión para realizar posteriormente el ensayo de viabilidad antes de liofilizar.²⁴

En bulbos estériles de forma homogénea, se distribuyó 1 mL de la suspensión de este microorganismo y se adicionaron 500 µL de leche descremada al 5 % más 500 µL de peptona a igual porcentaje como sustancias lioprotectoras.

Condiciones de liofilización

La liofilización se realizó en un equipo (liofilizador) Edwards modelo Modulyo. El proceso se inició con un pre-congelamiento fuera de la cámara del equipo liofilizador. Se utilizó alcohol isopropílico enfriado a -70 °C. El material congelado se sometió a la acción del vacío 10 Pa lo que produjo la sublimación. El proceso de liofilización terminó a las 20 h. Los bulbos se sellaron al vacío a una presión de 10 Pa y posteriormente, se almacenaron entre 2 y 8 °C para garantizar su estabilidad a largo plazo.^{10,25}

Ensayo de viabilidad y pureza

Para evaluar las características propias de la especie estudiada en tiempo cero y anualmente durante un periodo de cinco años, se restituyeron dos bulbos de la cepa en estudio a su volumen de liofilización con 2 mL de CTS, los cuales se mezclaron de forma homogénea para obtener una muestra representativa. Se comprobó la pureza y la

viabilidad. El criterio de aceptación considerado consistió en la obtención de cultivos puros con un orden de viabilidad mayor a 10^5 Unidades Formadores de Colonias (UFC) mL.

El ensayo de pureza se realizó por observación macroscópica de las colonias crecidas (forma, tamaño y color) y las características microscópicas del cultivo obtenido en ATS, teñido por el método de tinción de Gram.²⁷

Para evaluar la supervivencia del microorganismo a la liofilización, se realizó el recuento de UFC/mL por diluciones seriadas hasta 10^{-8} , se realizaron tres réplicas por cada una de las diluciones y siembra en superficie en ATS. Las placas se incubaron durante 18 a 24 h a 37°C .^{24, 26}

Identificación fisiológica y bioquímica

Se tomaron dos de los bulbos liofilizados, se restituyeron con 2 mL de CTS, se mezclaron e incubaron durante 1 h a 37°C . Transcurrido el periodo de incubación, se inocularon 50 μL de la suspensión en placas de (agar cetrimide, king A, king B y agar Mac Conkey), las cuales se incubaron durante 24 h a $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. Se realizó además, la prueba de oxidasa según Kovacs y el crecimiento en los medios agar hierro kligler, agar motilidad y oxidación/fermentación (O/F).^{28, 29}

Estudio estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre las diferentes variantes de sustancias lioprotectoras empleadas, se realizó un tratamiento estadístico.³⁰ Se empleó el Minitab, versión 14.0. Se tuvo en cuenta un nivel de significación $\alpha = 0,05$. En el estudio, se descartó la variante en la que se empleó el glicerol 20 % porque solo garantiza la viabilidad por 3 años.

Se comprobaron las condiciones previas: no normalidad y aleatoriedad para Vld (leche descremada al 20 %) y Vldp (leche descremada + peptona al 5 %). Se utilizó el método no paramétrico de Kruskal-Wallis para realizar las pruebas de hipótesis: método que solo exige que la variable sea independiente y permite comparar las medianas.^{31, 32}

Dócima 1:

H0: Las medianas son estadísticamente similares.

H1: Las medianas son diferentes.

Estadística descriptiva: Vld; Vldp

Variable	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Mediano	Máximo
Vld	7	383	847	1,00	100	2300
Vldp	7	374	853	10,0	20,0	2300

RESULTADOS

Teniendo en cuenta los resultados del estudio de estabilidad en tiempo real, obtenidos durante un periodo de cinco años, de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 1) pudo seleccionarse cuál variante, la de sustancia lioprotectora era la apropiada para la conservación de este microorganismo por largos período de tiempo.²¹

Tabla 1. UFC/mL del recobrado de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* durante cinco años, conservada en tres variantes de sustancias lioprotectoras.

Sustancia lioprotectora	Antes de la liofilización	Después de la liofilización					
		Años					
		24 h	1 ^{er}	2 ^{do}	3 ^{er}	4 ^{to}	5 ^{to}
Leche descremada 20 %	2,3 . 10 ⁹	1,1 . 10 ⁸	1,0 . 10 ⁸	1,6 . 10 ⁸	1,1 . 10 ⁷	1,9 . 10 ⁶	1,0 . 10 ⁶
Glicerol 20 %	2,3 . 10 ⁹	1,1 . 10 ⁸	2,0 . 10 ⁷	2,3 . 10 ⁶	3,8 . 10 ⁵	—	—
Leche descremada + Peptona al 5 %	2,3 . 10 ⁹	2,3 . 10 ⁸	3,2 . 10 ⁷	2,0 . 10 ⁷	1,1 . 10 ⁷	1,5 . 10 ⁷	1,0 . 10 ⁷

Los resultados de la evaluación de las características morfológico tintoriales y culturales de la cepa, correspondieron con el microorganismo en estudio (*Pseudomonas aeruginosa*). Las características observadas coincidieron con las descritas por Del Puerto, bacilos Gram negativos, alargados.²³ La observación microscópica arrojó la presencia de cultivos puros. Las colonias observadas concordaron con la morfología típica de la cepa de referencia ATCC 9027.¹⁹

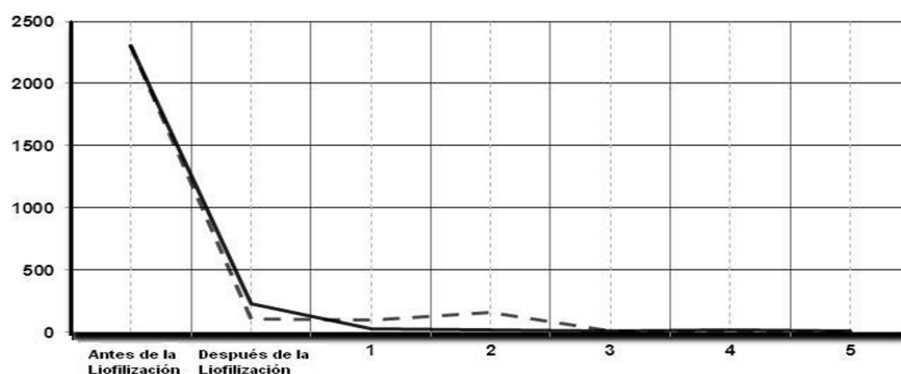
Los resultados morfológicos y bioquímicos permitieron la identificación taxonómica de esta cepa (Tabla 2)

El estudio estadístico arrojó que la probabilidad obtenida por el método de Kruskal-Wallis resultó 0,848 sin y con ajuste de colas, respectivamente, mayor que el nivel de significación 0,05; por lo que se rechazó, H1 (medianas diferentes) y aceptó H0 (medianas estadísticamente similares).³³

Tabla 2. Pruebas para la confirmación de especie *P. aeruginosa*.

Prueba	Criterio de aceptación
Producción de oxidasa	Desarrollo de color púrpura.
Siembra en agar hierro de kligler	Imagen alcalina de color rojo en todo el tubo, SH ₂ Negativo, gas Negativo
Siembra en agar cetrimide	Colonias redondas, lisas, de bordes regulares. Producción de pigmento verde (pioverdina)
Siembra en Mac Conkey	Colonias redondas, incoloras
Siembra en agar motilidad	Crecimiento alrededor del sitio de Inoculación
Siembra en medios king A y king B	Producción de pigmentos (piocianina y pioverdina)
Medio base de oxidación /fermentación (O/F)	Producción de ácido por oxidación de la glucosa y no utilización de lactosa
Crecimiento a 42 °C	Crecimiento positivo con formación de velo en la superficie
β hemólisis	Halo transparente verdoso alrededor de las colonias.
Fermentación de azúcares	Reacción negativa

Las variables Vld y Vldp leche descremada al 20% y leche descremada + peptona al 5 % respectivamente en función del tiempo de almacenamiento evidenciaron que no hay una marcada disminución en la viabilidad a los cinco años de conservación en ninguna de las dos variantes.(figura 1)



--- Vld (leche descremada 20%). ----Vldp (leche descremada +peptona 5%).

Figura 1. Células viables de *Pseudomonas aeruginosa* de las variantes (1 y 3) en función del tiempo de almacenamiento (años de cultivo).

DISCUSIÓN

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. Los resultados obtenidos antes y después de la liofilización de la suspensión del microorganismo en este trabajo, permite plantear que este no experimentó una pérdida significativa de viabilidad, es decir, que la metodología seguida durante el proceso de liofilización en la que se empleó leche descremada al 5 % más peptona 5 %, resultó apropiada, ya que sobrevivió a la liofilización; a pesar de que se conoce que las bacterias Gram positivas sobreviven mejor que las Gram negativas cuando se les liofiliza.^{5,6}

La observación microscópica y macroscópica de los cultivos demostró la presencia de un cultivo puro de la cepa conservada; las características morfológico tintoriales y culturales, mostraron que las colonias crecidas y los resultados de la tinción de Gram coinciden con los de la cepa en estudio.¹⁹

Los ensayos de identidad mostraron un comportamiento característico de acuerdo con la descripción de la especie. El análisis del crecimiento en medios selectivos, así como las propiedades bioquímicas y fisiológicas, fueron adecuadas para confirmar que la identidad de la cepa en estudio se correspondían con las características descritas en el

certificado de calidad de esta, como parte de su identificación, reportada por la ATCC. Lo que demuestra que se mantienen inalteradas las características propias de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.^{28, 29}

En cuanto a la conservación de los microorganismos mediante el método de liofilización, el punto limitante del es que aún hay poco conocimiento en la forma adecuada para preservar a las bacterias por este procedimiento y de acuerdo con los datos con que se cuenta, no existe un lioprotector universal para todas las cepas bacterianas por lo que se debe explorar la supervivencia a la liofilización para cada caso particular.⁶⁻⁸ El resultado del análisis de viabilidad de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* obtenido en este trabajo durante el tiempo objeto de estudio, corroboró que tanto la leche descremada al 20 % como sustancia lioprotectora como la mezcla de sustancias lioprotectores leche descremada al 5 % más peptona al 5 % permiten una buena supervivencia al usar ambas variantes para la conservación de este microorganismo, resultado que se corroboró estadísticamente con un 95 % de confiabilidad al demostrar que no existen diferencia estadística significativa entre estas dos variantes. Estos resultados pueden haber respondido a que la leche descremada (sustancia proteica) se recomienda como un lioprotector de excelencia por sus buenos resultados en la preservación de la viabilidad durante el proceso de liofilización.^{3, 8} Además, la peptona es un polipeptido que permite junto a la leche descremada mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización y lograr una buena apariencia del liofilizado (pastilla compacta, sin grietas y de fácil reconstitución).^{9,10}

La cepa *Pseudomonas aeruginosa*, depositada en la colección del laboratorio en igual periodo de tiempo y conservada bajo idéntica metodología, pero con el empleo de glicerol al 20 % como sustancia lioprotectora, evidenció una disminución en viabilidad a los tres años de conservada. Estos resultados coinciden con lo planteado por Parra que en su investigación hace referencia a la toxicidad del glicerol cuando se emplea como sustancia lioprotectora para la conservación de esta cepa.²⁶

CONCLUSIONES

En la conservación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la liofilización se comprobó que la formulación leche descremada + peptona al 5 % muestra resultados satisfactorios para la preservación del microorganismo, durante cinco años, de igual modo como ocurrió al emplear la leche descremada al 20 % en estudios previos realizados por el grupo de trabajo.

Se corroboró estadísticamente que ambas variantes no presentan diferencias significativas con un nivel de confiabilidad del 95 %, lo cual asegura que ambas variantes pueden ser utilizadas satisfactoriamente para la conservación de cepas de ese microorganismo por largos periodos de tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weng Z, Díaz OE, Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Rev Cubana Hig. Epidemiol.* 2005; **43(3)**: 1-7.
2. Weng Z. Conservación de microorganismos: importancia y retos. VII Taller sobre colecciones de cultivos microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2010. [Consultado 24 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>.
3. Smith D., Matthew R. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *Scientific World Journal.*: 805659. [Consultado 10 de mayo del 2013]. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353557/pdf/TSWJ2012-805659.pdf>
4. Sly L.I. Biodiversity and the Role of Microbial Resource Centres. Conference Proceedings 2010 no. 125250. Biodiversity and World Food Security. [Consultado 10 de mayo del 2013]. Disponible en: <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/125250/2/Sly2010.pdf>
5. Palazón Z, Delgado AM. Estudio y desarrollo de un método de conservación de cepas. V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2006. [Consultado 22 de septiembre de 2010] Disponible: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>.
6. Stell KJ, Ross HE. Survival of freeze dried bacterial cultures. *J Appl Microbiol.* 2008; **26** (3): 370-375.
7. Winters RD, Washington C. A Simple, Effective Method for Bacterial Culture Storage: A Brief Technical Report. *Journal of Bacteriology and Virology.* 2010; **40**(2): 99-101
8. Sotolongo J. Conservación de microorganismos por liofilización. V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2006. [Consultado 22 de septiembre de 2010] Disponible: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>. ISBN978- 959-7076-13-6.
9. Ivano RV. The brazilian reference culture collection. *Boletín FELACC.* 2009;(2): 5-7
10. Giono S, Arteaga RI. Recomendaciones generales para la liofilización de cultivos microbianos. *Boletín FELACC.* 2010 (4): 2-4
11. Morales YE, Duque E, Rodríguez O, De la Torre J, Martínez RD, Pérez R, et. al. Bacterias Preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Rev Biotecnología Aplicada.* 2010; **14**(2): 11-29.
12. Del Puerto CA, Iglesias E, Morales T, Baños N, Nocedo MD, Carnota GY, et al. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *Rev. Vaccimonitor.* 2009; **18** (1): 20-24

13. Prakash O, Shouche Y, Jangid K, Kostka JE. Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the OMICS era. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013; 97(1): 51-62.
14. Iglesias E, Morales M, Morales R, Weng Z, Cabrera R, Del puerto C, *et al.* Colecciones cubanas de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. VI Taller de Colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. La Habana: Ediciones Finlay; 2008. [Consultado 26 de septiembre de 2010] Disponible en: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>
15. Iglesias E, Del Puerto CA, Martínez R, González M, Baños N, Simón B, *et al.* Establecimiento del cepario central del polo. VII Taller sobre colecciones de cultivos microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2010. [Consultado 24 de septiembre de 2011] Disponible en: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>.
16. Uruburu F. History and services of culture collections. *Int Microbiol*. 2003; 6 (2): 101-103.
17. Smith D. Culture collections over the world. *Int Microbiol*. 2003; 6(2): 95-100.
18. Smith D, Ryan MJ. Culture collections in the twenty first century. *Biologist*. 2001; 48(3): 125-8.
19. American Type Culture Collection Technical Bulletin no.6 Reference strains: How many passages are too many? Reprinted from ATCC Connection. 2003; 23 (2) :6-7.
20. World Federation of Culture Collection. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd ed. Japan: WFCC Executive Board; 2010. [Consultado 22 de septiembre de 2012] Available from: <http://www.wfcc.info/guidelines/>
21. Burguet N, Sierra N, Brito L. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 2012; 43(3): 151-154.
22. Prakash O, Nimonkar, Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*. 2013; 339(1):1-9
23. Del Puerto CA, Callicó A. Preservación de *Pseudomonas aeruginosa* por liofilización. Resultados preliminares. V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2006. [Consultado 22 de Septiembre del 2010] Disponible: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>.
24. The United States Pharmacopeia 35 th Ed. USP 35-NF30. Vol. 1 Pruebas biológicas/<62> Examen Microbiológico. The United States Pharmacopeia convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville MD 20852; USA: 2012: 64.
25. Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, McIver KS, Hagman KE, Ott CM, *et al.* Skim milk enhances the preservation of thawed -80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*. 2008; 75 (1): 135-138.
26. Parra SL, Pérez M, Bernal M, Suárez Z, Montoya D. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Publicación científica* 2006; 5(4): 39-49.
27. Fernández P. Manual de Microbiología General. Capítulo 15 Obtención y Aislamientos de cultivos puros. Ciudad de la Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1983: 31-35
28. Prieto M. Bacilos gramnegativos no fermentadores (monografía en Internet). Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2006. Consultado 15 Enero del 2010] Disponible en: <http://www.aam.org.ar/actividades/T2-3.pdf>
29. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Willians ST. *Bergey' Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Group 4 Gram- negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. Subgroup 4A. Genus *Pseudomonas*. Willians & Wilkins Baltimore, Marylan 21202; USA 1994: 93
30. *Arsham H.* Statistical Thinking for Decision Making: Revealing Facts from Figures. Ed. EOF, 2003. [Consultado el 10 de mayo de 2013]. Disponible en: <http://ubmail.ubalt.edu/~harsham/#rrinstr>
31. Rowe P. *Essential Statistics for the Pharmaceutical Sciences*. Ed. UK: Wiley, 2007.
32. NIST Statistic Handbook. 2005. NIST Statistic Handbook.pdf. [Consultado el 10 de mayo de 2013] Disponible en <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/eda.htm>
33. *Espejo I, Fernández P., López MA, Muñoz M, Rodríguez AM, Sánchez A, Valero C.* Inferencia Estadística. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, Marzo 2007.