

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



321

**“Creación y Funcionamiento de una Colección de Cepas
Microbianas en la Facultad de Química, U. N. A. M.”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

IGNACIO SANCHEZ PEON
RAMON FELEMOVICIUS DOLENGEVICH

1 9 7 4



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LAB. Tesis

ABO. 1974

FECHA

PROG. Hist.

*8

~~98~~ ~~97~~ 96



LOJA - ECUADOR

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

" CREACION Y FUNCIONAMIENTO DE UNA COLECCION DE CEPAS
MICROBIANAS EN LA FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M. "

PRESIDENTE PROF.: OSCAR AMOR DODERO

V O C A L PROF.: MAGDALENA ACOSTA SEGURA

SECRETARIO PROF.: CATALINA OROZCO VICTORIA

1er.SUPLENTE PROF: RAMON LARA AGUILERA

2o.SUPLENTE PROF: ROSA MARIA RAMIREZ GAMA

Sitio donde se desarrolló el tema: LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE QUIMICA.

NOMBRE COMPLETO DE LOS SUSTENTANTES: IGNACIO SANCHEZ PEON
RAMON FELEMOVICIUS DOLENCEVICH

NOMBRE COMPLETO DEL ASESOR DEL TEMA:
Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

JOSE SANCHEZ VILLALOBOS
MARIA TERESA PEON DE SANCHEZ
CON RESPETO Y AGRADECIMIENTO.

CON CARIÑO A MIS HERMANOS Y EN ESPECIAL A HIRAM, QUE TANTO
ME AYUDO EN MI CARRERA.

A REGINA

A MI ESCUELA.

A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS.

A MIS PADRES:

SAMUEL FELEMOVICIUS KAPLAN
JOSEFINA DOLENGEVICH DE FELEMOVICIUS

QUE SIEMPRE ME GUIARON POR UN BUEN CAMINO

A MI ABUELITA:

RAQUEL DOLENGEVICH STUTZ

A MIS HERMANOS, HERMANA, CUÑADAS Y SOBRINOS CON MUCHO CARÍÑO

A MIS TIOS Y PRIMOS

A YUDIS CON MUCHO AMOR

A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS

UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL A LA
MAESTRA Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA S.
POR SU ATINADA GUIA EN LA REALIZA-
CION DE ESTE TRABAJO.

I.S.P. y R.F.D.

"...Hilel decía: Quien no aumenta su saber lo destruye... Y también solía decir: Si yo no por mí, ¿quién por mí? , Y si no estoy en mi favor ¿quien soy yo? Y si no ahora, ¿Cuándo? ... "

(P.A. 1: 13-14)

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	1
I.- ANTECEDENTES Y GENERALIDADES	3
II.- CONTROL ADMINISTRATIVO DE UNA COLECCION DE CEPAS	10
III.- PROCESO DE LIOFILIZACION	30
IV.- ESTUDIO DE LA CEPAS MICROBIANAS POR LIOFILIZAR	53
V.- MATERIAL Y METODOS	58
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	74

INTRODUCCION

A través de la Historia, la humanidad se ha preocupado siempre por coleccionar diversos tipos de objetos y organismos, y gracias a esto, se han podido conservar muchos conocimientos, que de otra forma se hubieran consumido con el paso del tiempo.

Consideramos que una colección de cualquier tipo, para ser realmente valiosa, debe aportar algo a cierta comunidad, y ser de provecho para ella.

El trabajo que aquí presentamos, tiene por objeto iniciar una Colección de Cepas en nuestra Facultad, y con ello, prestar un servicio al área de Microbiología.

La Colección se encargará de conseguir cepas y mantenerlas en estado liofílico, método apropiado para la mayoría de cepas, según se verá a lo largo de esta Tesis. Estas cepas serán controladas antes y después de someterlas al proceso de liofilización para tener la mayor información posible sobre ellas.

El proyecto es que la Colección llene las necesidades, primeramente de la propia Facultad, ya sea en prácticas o trabajos de investigación, y como ayuda a nuestros compañeros

para que puedan realizar su Servicio Social, trabajos y Tesis. Posteriormente, la Colección podrá prestar servicio a otras instituciones dentro de la Universidad así como a la Industria, y estará en contacto con hospitales e instituciones de salud pública que estén interesados en estudios con microorganismos y que puedan proporcionar cepas a la Colección. Además es importante la relación con otras Colecciones de Cepas nacionales y extranjeras.

CAPITULO I

ANTECEDENTES Y GENERALIDADESANTECEDENTES

La colección de materiales biológicos y su preservación para diferentes fines, debe remontarse seguramente a la época de Linneo, o quizás a épocas anteriores.

Las primeras colecciones de organismos vivos fueron herbarios así como colecciones comparables de insectos, pájaros, etc. Estas representan una importante faceta en investigaciones botánicas y zoológicas. Estas colecciones estaban formadas generalmente por organismos muertos disecados que son útiles sólo para estudios comparativos de estructura y morfología incluyendo los detalles que pueda aportar la microscopía "post-mortem".

Por razones obvias, la colección y el catálogo de organismos inferiores se desarrolló más lentamente; pero a principios del Siglo XIX ya se empezaban a hacer colecciones principalmente de hongos y algas. Sin embargo, no fue hasta que en la segunda mitad del Siglo XIX, cuando los pioneros de la Microbiología, como el micólogo De Bary, el bacteriólogo Koch y el zimólogo Hansen, desarrollaron técnicas para propagar microorganismos en forma de cultivos puros y reproducibles en el laboratorio. Estos nuevos descubrimientos dieron por-

resultado las primeras colecciones de microorganismos vivos, aunque éstas tenían un campo limitado al interés especial de los investigadores y no contaban con técnicas especiales de preservación.

Las colecciones particulares de muchos investigadores fueron la base para la creación de grandes centros dedicados exclusivamente a conservar y estudiar gran diversidad de microorganismos. Como ejemplo de estas instituciones tenemos la -- American Type Culture Collection, en los E.U.A., y la Central Bureau Voor Schimmel Cultures, en Holanda.

GENERALIDADES

Los primeros intentos de preservar cultivos fueron hechos -- transfiriendo a los microorganismos de su habitat natural a material fresco y no infectado del mismo tipo. El principal problema que presentaban las primeras técnicas de cultivo -- eran de esterilidad de los medios de cultivo y del material.

Los medios de cultivo que se usaron primeramente, fueron extractos de tejidos animales o vegetales, (frutos, semillas, -verduras, etc.) solidificados adicionando gelatina. Con la introducción del agar como agente solidificador relativamente inerte, por Frau Hesse alrededor de 1880, se incrementó el - uso de los medios de cultivo sólidos.

Posteriormente, se siguieron usando extractos naturales como nutriente de medios de cultivos, lo cual se hace hasta hoy -

en día cuando se buscan los extractos más apropiados para el crecimiento de los diversos microorganismos.

Para asegurar una mejor reproducibilidad y para facilitar -- los estudios bioquímicos y fisiológicos, la atención de los investigadores se ha dirigido hacia medios de cultivo de com posición conocida, que se designan como medios "sintéticos".

Ya en 1869, Raulin introdujo una solución nutriente conte-- niendo cantidades medidas de sacarosa, aminoácidos, ácido -- tartárico y nitrato de amonio, junto con otras sales para sus estudios con Aspergillus niger. Un medio similar, atribuido a Czapek se convirtió en uno de los más usados para cultivar hongos y fué introducido en E.U.A. por Dox.

Al mismo tiempo, los microbiólogos de muchos países buscaron soluciones nutrientes de composición conocida para estable-- cer el valor nutricional de diferentes carbohidratos, fuen-- tes de nitrógeno, iones metálicos, vitaminas, etc.

Ya sea que fueran extractos naturales o mezclas de composi-- ción conocida, estos nutrientes fueron solidificados con - - agar y generalmente colocados en tubos inolinados y así usa-- dos como superficies para transferir los cultivos a interva-- los regulares, según se requiera para organismos específicos.

Este procedimiento conocido como resiembras en agar inclina-- do, es aún muy usado ya que tiene varias ventajas:

- a).- Se pueden transferir las cepas fácil y rápidamente.
- b).- La pureza y variabilidad del cultivo pueden ser verificados durante el desarrollo.
- c).- Si son almacenados a 4°C después de que el desarrollo (incluyendo la esporulación) es completo, pueden permanecer viables por meses y en algunos casos por varios años si se previene la desecación del medio utilizando tubos con tapón de plástico.

El medio de cultivo, la temperatura de incubación y todas las condiciones de preservación deben ser estandarizadas para minimizar la reproducción y producción de metabolitos indeseables para la viabilidad.

Algunos investigadores (Westerdijk) probaron alternar los substratos alimenticios en pases periódicos sucesivos y tuvieron éxito en la preservación de una colección bastante grande y diversa de hongos.

Otra técnica bastante usada, es la siembra "en piquete", que consiste en inocular superficies planas en un sólo punto a partir del cual se propaga el cultivo; generalmente se hace en un tubo, introduciendo el asa casi hasta el fondo. En este método el desarrollo no es muy abundante, con lo cual se evitan pases constantes de la cepa.

Para reducir los procesos metabólicos y retardar el proceso de envejecimiento, también se puede recurrir a otros procedi

mientos como cubrir el crecimiento microbiano con aceite mineral estéril. Este método fue recomendado primeramente, por Lumiere y Chevrotier, para extender la longevidad y reducir la variabilidad de gonococos en cultivos con suero. Desde entonces ha sido usado para preservar muchos otros microorganismos. Se usa principalmente para microorganismos que no pueden ser preservados por liofilización como es el caso de algunos ficomicetos acuáticos. Otro método usado es la preservación en tierra o arena estéril, que se introdujo en el período de 1910 a 1920. Como dato interesante, podemos mencionar el hecho de que Omeliansky encontró aún viables cultivos de Clostridium pasterianum, 24 años después de haber sido preservados en arena estéril por Winogradsky.

Por lo que a la desecación de cultivos se refiere, muchos investigadores han descrito procedimientos de secado relativamente simples para preservar cultivos y estos métodos han tenido muchas modificaciones dependiendo el material que se quiere conservar. Fenell dió la pauta sobre estos procedimientos dando algunas indicaciones:

- 1.- Es preferible una rápida desecación al vacío a un secado lento.
- 2.- La presencia de materiales protectores como por ejemplo: suero o leche, incrementa la supervivencia.

3.- Los cultivos secos tienen una viabilidad mayor si se conservan en refrigeración; podemos citar varios ejemplos en los que se aplican los conceptos anteriores:

Brawn preservó neumococos y estreptococos hemolíticos de 4 a 12 años, secando las células en suero o sangre sobre tiras de papel filtro y en botellas al vacío conteniendo CaCl_2 .

Rhodes reportó 88% de supervivencia en períodos mayores de 13 años de 61 géneros de hongos, mediante el secado de esporas y micelios en gotas de suero equino usando P_2O_5 como deshidratante, combinando con vacío y finalmente cerrado hermético.

A partir del método anterior se desarrolló una técnica que combina la congelación con el secado al vacío llamada liofilización, que ha resultado muy conveniente y se puede usar para una gran cantidad de microorganismos.

Los procedimientos de secado a partir de un estado de congelación se ha practicado desde los trabajos de Sharrill en 1909 y Hammer dos años después. Por muchos años se limitó el estudio a bacterias, virus y preparaciones inmunológicas hasta que en 1942 se aplicó (Fenell y Raper) a una gran cantidad en hongos. En este trabajo obtuvieron los siguientes resultados:

De 78 especies de *Aspergillus* y 140 de *Penicillium*, sólo dos especies de este último no eran viables después de 17 años, sólo 31 (8.8%) no eran viables.

Hay ciertos hongos que no pueden ser conservados por este método como por ejemplo, algunos Ficomicetos acuáticos como se mencionó antes.

La conveniencia de la liofilización como método para -- preservar la mayoría de los microorganismos ya ha sido bien establecida. Son muchos los reportes de las aplicaciones exitosas: Se conserva la viabilidad, la contaminación es relativamente fácil de evitar y cuando la liofilización se hace apropiadamente, la variabilidad en los cultivos de células o esporas liofilizadas es mínima.

CAPITULO II

CONTROL ADMINISTRATIVO DE UNA COLECCION DE CEPAS

Deben ser considerados algunos aspectos principales en lo -- que concierne a colecciones de cultivos:

- 1.- La diferenciación de las Colecciones en Especializadas y Generales o de Servicio.
- 2.- Definir su campo y su función.
- 3.- La responsabilidad de las Colecciones de Servicio como centros de depósito y distribución.
- 4.- Colecciones de Cepas como centros activos de estudio; - cooperación entre Colecciones de Servicio y Especializadas.
- 5.- La necesidad de un servicio de identificación.

Se entiende por una Colección Especializada la que es necesaria principalmente para trabajo de investigación dentro de - la institución que mantiene la colección.

En las colecciones Generales o de Servicio, el propósito de mantener las cepas es servir a todos los microbiólogos interesados. Estas están organizadas internacionalmente y man-- tienen un amplio surtido de microorganismos, como por ejem--

plo: la American Type Culture Collection (A.T.C.C.) y la -- Central Bureau Voor Schemmel Cultures (C.B.S.).

Las Colecciones Especializadas pueden estar referidas a de-- terminada área, por ejemplo: de interés médico, industrial, etc.; o a una determinada especie de microorganismos, como - es una colección del género Penicillium, Salmonella, o Cáñdi da, etc.

Las Colecciones Especializadas en un área determinada pueden clasificarse en:

- a).- Colecciones médicas y veterinarias.
- b).- En Colecciones fitopatológicas y agrícolas.
- c).- Colecciones industriales.
- d).- Colecciones de laboratorio para universidades y centros de enseñanza e investigación pura.

"Del buen funcionamiento de una Colección Especializada de - microorganismos, puede depender la salud pública de un país- o el rendimiento de las cosechas". (A.L. Van Beverwijk).

Los institutos médicos y veterinarios tienen cepas de diferen- tes tipos serológicos, listas para hacer un diagnóstico en ca- so que se presente una epidemia; en institutos fitopatológi- cos se estudian los ciclos de vida de parásitos de plantas, - con el fin de tomar las medidas necesarias cuando se presen- te una plaga en determinadas plantas. En esta forma, se de-

fine el campo y la función de las cepas.

Las Colecciones de tipo General o de Servicio tienen dos funciones:

Preservar cepas y especies de interés y distribuir subcultivos de éstas. Como centro de depósito, las Colecciones Generales deben asegurar la continuidad de microorganismos de importancia científica y/o industrial.

Para la preservación de las cepas deben buscarse los métodos más apropiados según el tipo de microorganismo.

El segundo propósito de una Colección de Servicio es que las cepas estén fácilmente disponibles para la gente interesada. Las principales responsabilidades que tiene un centro de distribución de cepas son las siguientes:

- a).- Mantener una gran diversidad de cepas y especies, según el interés que tengan.
- b).- Estar al tanto de la literatura sobre temas de bioquímica y taxonomía, de tal forma que puedan ser incorporadas a la colección, nuevas cepas.
- c).- Preservar los organismos en la mejor condición posible.
- d).- Llevar un control detallado de los datos concernientes a las cepas y proporcionar estos datos cuando sean requeridos.

- e).- Antes de proporcionar las cepas deben ser verificados todos los datos y comprobar que no haya contaminación, o que sean atípicas.
- f).- Una pronta respuesta a los requerimientos.
- g).- Publicar un catálogo con las cepas disponibles, dando la información pertinente de cada cepa en forma clara y concisa. Dar al catálogo una amplia difusión y publicarlo en forma regular.

En realidad, todos los requisitos para el buen funcionamiento de una colección de cultivos, son fácilmente estipulables, pero difícilmente realizables.

La colección que proyectamos crear en nuestra Facultad, tiene de a ser una Colección General o de Servicio, y aspiramos a que sean cumplidos los requisitos mencionados.

Según Van Beverwijk, debe haber una estrecha relación entre Colecciones Generales y Especializadas; las Generales pueden proveer a las Especializadas de las cepas necesarias y éstas a su vez proporcionan nuevos microorganismos aislados.

Las Colecciones Generales poseen siempre, datos de patogenicidad y propiedades bioquímicas de sus cepas, pero generalmente no están equipadas para comprobarlos; por esto, es importante que las propiedades de una cepa sean verificadas -- por especialistas de tiempo en tiempo.

A veces sucede que un organismo usado en investigación ya no muestra las propiedades esperadas, simplemente por alguna contaminación o mutante, que no fue detectada por el investigador o por otra razón. En estos casos deberá ser consultado el taxonomista de una Colección General para verificar la identidad de una cepa. Por ello, es necesario contar con un servicio de identificación de cepas.

Las colecciones grandes con un gran número de cepas, son una buena base para dar este servicio, ya que los taxonomistas tienen a su disposición una extensa literatura, cultivos auténticos y de primo aislamiento, que pueden ser usados para estudios comparativos y además la experiencia en su campo.

Es conveniente que una colección esté relacionada con especialistas y con otras colecciones de renombre, para así tener una información correcta de nuevos estudios realizados.

Todas las personas responsables de los cultivos deben estar familiarizadas con los mismos y con las técnicas de preservación.

Debe llevarse un registro de las cepas que se reciben y de las que se despachan para poder hacer una relación de las cepas que tienen más demanda.

Una colección de cepas debe ser un constante centro de investigación en el cual se busquen nuevas técnicas de preservación o modificaciones a las ya existentes, se estudien los

procesos y sus efectos sobre las diferentes propiedades de los microorganismos así como muchos otros aspectos que pueden ser base de investigaciones.

ACEPTACION DE NUEVAS CEPAS:

En una colección bien organizada, toda nueva cepa que es aceptada ya sea liofilizada o en estado activo debe ser comprobada inmediatamente en cuanto a su viabilidad y su pureza. Para llenar este requisito la recepción de cultivos debe ser regulada, ya que muchas veces las cepas recibidas no pueden ser reactivadas, debido a que en ocasiones se ignoran las propiedades de los organismos en estudio. Por lo tanto, al recibir una cepa, ésta debe venir acompañada de toda la información necesaria para su estudio, por ejemplo: temperatura óptima, medio de cultivo adecuado, etc.

Después que se ha obtenido crecimiento del cultivo, se comprueban la pureza, las propiedades morfológicas y bioquímicas según el reporte del donador.

El siguiente paso después de haber concluido todas las pruebas, es darle a la cepa un número de registro y anexarle una hoja de control de datos. Entonces, la cepa está preparada para ser preservada por liofilización u otro método adecuado.

Después de haber concluido el proceso de conservación, se vuelven a comprobar a diferentes intervalos de tiempo (depen

diendo de la cepa) la viabilidad, pureza y demás propiedades, para verificar si ha sido correcta la técnica de preservación.

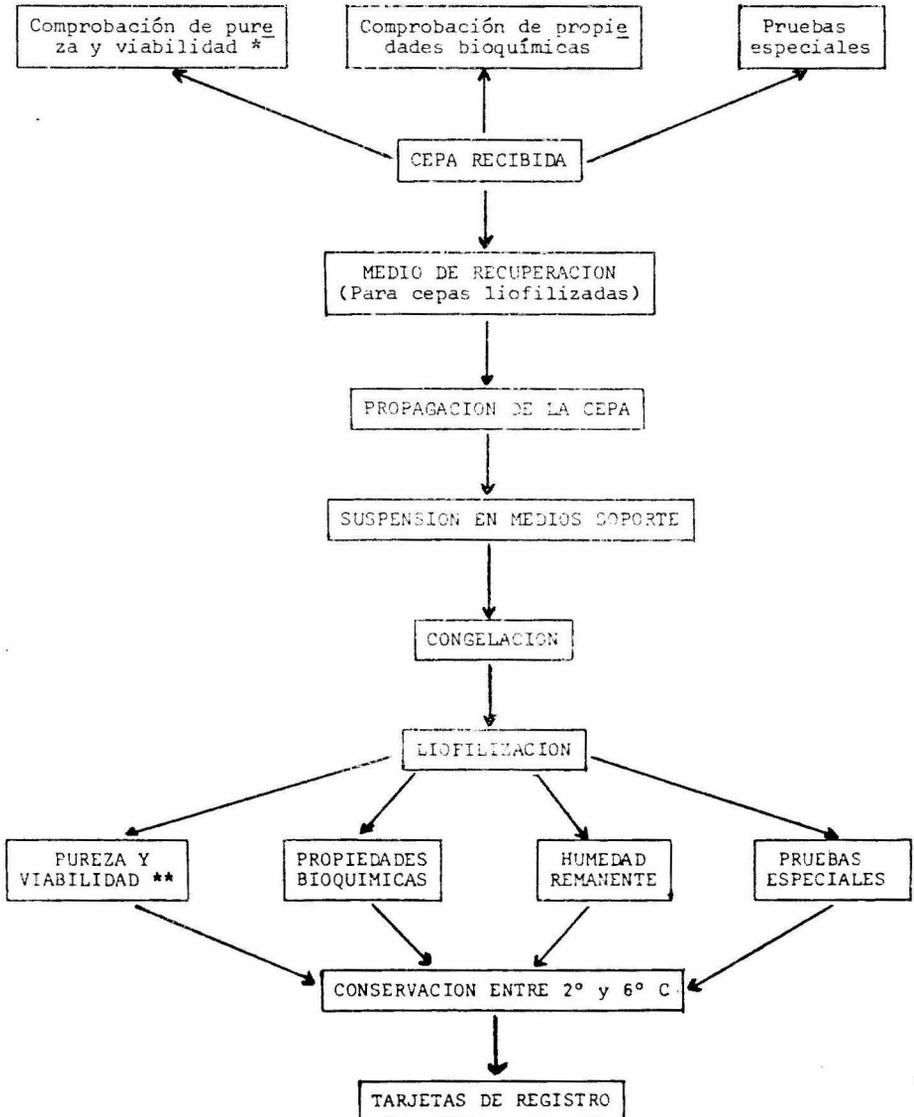
Es conveniente hacer antes y después del proceso de preservación, un conteo de microorganismos viables para saber si el proceso se llevó a cabo en condiciones adecuadas.

En lo que respecta a nomenclatura de cepas, los bacteriólogos se basan en el Manual de Bergey; para levaduras se usa la Monografía de Lodder y Kreger-Van Rij. Los cambios en la nomenclatura de hongos, son publicados en varias revistas micológicas y también en revistas de botánica o microbiología general.

Se sugiere la siguiente información, para que sea anexada a cada cepa:

- A.- Número de registro.
- B.- Nombre científico del microorganismo.
- C.- Sinónimos.
- D.- Nombre del donador con su número de registro.
- E.- Cepa de "primo aislamiento" o derivada de material tipo.
- F.- Fecha de entrada a la colección.
- G.- Sustrato del cual fue aislada la cepa, país y fecha de aislamiento.
- H.- Un resumen sobre datos de patogenicidad, propiedades bioquímicas y aplicaciones.
- I.- Referencia de literatura pertinente. Número de patente (si lo tiene).
- J.- Número de registro de la cepa en otras colecciones.

MANEJO GENERAL DE UNA CEPA



* Prueba cuantitativa de viabilidad.

** A diferentes intervalos de tiempo.

SISTEMA DE NUMERACION:

Los números de registro se asignarán a las cepas por orden alfabético de acuerdo a la Tabla #1. Cada especie de microorganismo tendrá un número diferente. El número de cepa se representará por un número progresivo después del número de registro, por ejemplo: en la Tabla #1 aparecen 3 cepas de Escherichia coli con el mismo número de registro (191), pero cada una tiene otro número de cepa: 191-1; 191-2; 191-3.

Los ejemplos de la Tabla #1 nos muestran la forma de asignar número de registro y número de cepa.

TARJETAS DE CONTROL:

Cada cepa que sea incluida en la colección, recibirá un número de registro y tendrá un conjunto de tarjetas de control. A continuación presentamos y explicamos el objeto de cada una de las tarjetas:

Tarjeta # 1: Características Generales.-

Aquí se anotará toda la información que se obtenga de la cepa; se incluirán datos de morfología macro y microscópica, propiedades bioquímicas, patogenicidad, referencias bibliográficas, etc.

En esta misma tarjeta se anotarán las condiciones de crecimiento y forma de las colonias microbianas en diferentes medios de cultivo.

Esta tarjeta es sumamente importante ya que servirá de base para cualquier estudio que se lleve a cabo de la cepa; además, de aquí se obtendrán los datos necesarios para dar la información requerida cuando una cepa es solicitada. Si el solicitante desea toda la información que se tiene, entonces se le dará una copia de esta tarjeta, pero en la mayoría de los casos, sólo se proporcionarán los datos que sean de especial interés para el solicitante.

En caso de recibir alguna cepa con poca o ninguna información, se procurará llevar a cabo la mayor cantidad posible de estudios para poder caracterizarla adecuadamente. Todas las pruebas que se realicen serán anotadas en esta tarjeta.

Tarjeta # 2: Datos de liofilización - Control.-

Los datos anotados en esta tarjeta serán de utilidad para conocer las condiciones en que se ha llevado a cabo la preservación de la cepa por liofilización. Además, esta tarjeta incluye el control de la cepa antes y después del proceso, lo cual tiene por objeto valorar la forma en que se ha realizado la liofilización. Los datos que deberán controlarse antes y después del proceso son principalmente la pureza, viabilidad y pruebas bioquímicas de rutina.

Es muy conveniente determinar la humedad residual de la cepa liofilizada, ya que esto nos permite valorar si el tiempo de liofilización fue adecuado. Además, se llevarán a cabo pruebas específicas según el tipo de microorganismo.

Tarjeta # 3: Estabilidad de la Cepa.-

Este control consiste en realizar cuentas de microorganismos viables a diferentes intervalos de tiempo después de la liofilización, con el objeto de determinar la estabilidad de la cepa.

Por regla general, si una cepa liofilizada adecuadamente se mantiene entre 4 y 6° C, su viabilidad disminuirá lentamente y sus propiedades bioquímicas y genéticas permanecerán invariables durante varios años. El máximo tiempo que una cepa liofilizada permanece viable, obviamente varía mucho según el tipo de microorganismo y según las condiciones en que se haya realizado la liofilización y el mantenimiento posterior.

Tarjeta # 4: Distribución de la cepa.-

Es necesario llevar un perfecto control de la entrada y salida de cepas, para que en un momento dado, se sepa cuántas ampollas hay en existencia de cada cepa en la colección. -- También deberán anotarse los nombres de las personas o instituciones a las cuales se proporciona la cepa para controlar la distribución y además porque posteriormente se puede obtener información del uso que se le dió a la cepa y de los estudios realizados.

Tarjeta # 5: Información específica de la cepa.-

Esta tarjeta se llenará y se anexará a cada pedido de cepas. Se incluyen los datos mínimos que debe conocer quien requie-

re la cepa; además se incluirán otros datos que sean solicitados, los cuales pueden obtenerse de la Tarjeta # 1. Si el solicitante requiere todos los datos que se tienen de la cepa, se le proporcionará una copia de Tarjeta # 1 completa.

CATALOGO:

Cuando la Colección de Cepas esté bien establecida y empiece a funcionar, se hará un catálogo de las cepas en existencia-colocado por orden alfabético y que incluirá todas las cepas que están ya listas para ser distribuidas.

Se piensa incluir en este catálogo anotaciones breves, acerca de los datos más importantes concernientes a la cepa. Deberá publicarse periódicamente.

DISTRIBUCION DE CEPAS:

Toda persona o institución interesada en adquirir alguna cepa de la colección, deberá presentar una solicitud en hojas-membretadas del laboratorio o institución conocida que requiere la(s) cepa(s). Esto no es un mero "trámite burocrático", sino más bien una medida necesaria para asegurarse, hasta donde sea posible, que la cepa no será usada para fines negativos, y exista una responsabilidad legal.

Antes de entregar una cepa requerida, deberán ser rectificad^os, la mayor cantidad de datos posibles, que se haya determinado anteriormente. Se deben comprobar por lo menos, la pureza y la viabilidad.

Cada ampolleta deberá estar debidamente etiquetada en el interior con la fecha de liofilización, el número de liofilización, el nombre y el número de registro de la cepa (la técnica para etiquetar los tubos en el interior, se menciona en el capítulo de Material y Métodos).

En un instructivo contenido en los envases aparecerán las instrucciones para la rehidratación, manejo y conservación de la cepa.

Cuando una cepa requiera ser transportada, se deberá tener cuidado de empacar adecuadamente las ampolletas para evitar su ruptura durante la transportación y se marcarán los empaques con indicaciones como: " PELIGRO" - "CONTIENE MICROORGANISMOS" , "MANTENGASE EN LUGAR FRESCO" , etc.

TABLA # 1

SISTEMA DE NUMERACION DE LAS CEPAS

AA-AL.....001-020	IM-IZ.....341-360	RM-RZ.....701-720
AM-AZ.....021-040	JA-JL.....361-380	SA-SL.....721-740
BA-BL.....041-060	JM-JZ.....381-400	SM-SZ.....741-760
BM-BZ.....061-080	KA-KL.....401-420	TA-TL.....761-780
CA-CL.....081-100	KM-KZ.....421-440	TM-TZ.....781-800
CM-CZ.....101-120	LA-LL.....441-460	UA-UL.....801-820
DA-DL.....121-140	LM-LZ.....461-480	UM-UZ.....821-840
DM-DZ.....141-160	MA-ML.....481-500	VA-VL.....841-860
EA-EL.....161-180	MM-MZ.....501-520	VM-VZ.....861-880
EM-EZ.....181-200	NA-NL.....521-540	WA-WL.....881-900
FA-FL.....201-220	NM-NZ.....541-560	WM-WZ.....901-920
FM-FZ.....221-240	OA-OL.....561-580	XA-XL.....921-940
GA-GL.....241-260	OM-OZ.....581-600	XM-XZ.....941-960
GM-GZ.....261-280	PA-PL.....601-620	YA-YL.....961-980
HA-HL.....281-300	PM-PZ.....621-640	YM-YZ.....981-1000
HM-HZ.....301-320	QA-QL.....641-660	ZA-ZL.....1001-1020
IA-IL.....321-340	QM-QZ.....661-680	ZM-ZZ.....1021-1040
	RA-RL.....681-700	

EJEMPLOS:

Aspergillus sp.	028-1	Salmonella sp.	702-1
Aspergillus fumigatum ..	029-1	Salmonella sp.	702-2
Aspergillus niger	030-1	Salmonella typhi	703-1
Brucella abortus	065-1	Salmonella paratyphi	704-1
Candida albicans	082-1	Salmonella typhi	703-2
Escherichia coli	191-1	Salmonella typhimurium	705-1
Escherichia coli	191-2	Salmonella typhi	703-3
Escherichia coli	191-3	Shigella disenterie	709-1
Micrococcus sp.	485-1	Tricophyton rubrum	771-1
Neisseria gonorrhoe	524-1	Tricophyton tonsurans	772-1

TABLITA # 1

CARACTERISTICAS GENERALES

Nº DE CEPA _____ NOMBRE _____ PROCEDENCIA _____
FECHA DE ENTRADA _____ SINONIMOS _____
Nº REG. DEL DONADOR _____ PAIS Y FECHA DE AISLAMIENTO _____
SUSTRATO _____ Nº REG. EN OTRAS COLECCIONES _____

MORFOLOGIA:

Forma _____ Tamaño _____ micras Agrupamiento _____

CITOLOGIA:

Tinción de Gram ____ Acido-alcohol resistencia ____ Cápsula ____ (otras) _____
Movilidad ____ Esporas _____ Células _____
(unicelular, multicelular, ramificada).

METABOLISMO:

Aereación: _____ % de CO₂ que favorece el crecimiento ____ Temp. óptima ____ pH ópt. ____
Pigmentos _____ Otros productos de biosíntesis _____

CONDICIONES DE CRECIMIENTO:

MEDIOS DE CULTIVO

pH óptimo _____

Temperatura óptima _____

Tiempo de incubación _____

Otras _____

COLONIAS:

Forma _____

Tamaño _____

Superficie _____

MEIUM DE CULTIVO

Color _____

Opacidad _____

Consistencia _____

PRUEBAS BIOQUIMICAS:

Reducción de nitratos _____ Oxidasas _____ Indol _____ H₂S _____ Sales de amonio _____ Rojo de metilo _____

Citrato de Simmons _____ Catalasa _____ Urea _____ KCN _____ Hidr. gelatina _____ Voges/Proskauer _____

Coagulación y/o digestión de suero _____ Digestión de huevos, carne, otros _____

GLUCOSA _____ MALTOSA _____ LACTOSA _____ SORBITOL _____ SACAROSA _____ ARABINOSA _____ XILOSA _____

DEXTRINA _____ GLUCOGENO _____ MANITOL _____ RIBOSA _____ FRUCTOSA _____ SALICINA _____ INOSITOL _____

DULCITOL _____ RAMNOSA _____ GLICEROL _____ RAFINOSA _____ ALMIDON _____ ADONITOL _____

(OTRAS) _____

PRUEBAS ADICIONALES:

Pruebas serológicas _____

Patogenicidad _____

(OTRAS) _____

REFERENCIAS DE LITERATURA PERTINENTE:

TARJETA # 2
DATOS DE LIOFILIZACION

Nº DE LIOF. _____ FECHA _____
MEDIO DE CULTIVO _____ M. DE PROPAGACION _____ M.SOPORTE _____
FORMA DE CONGELAR _____ TEMP. ALCANZADA _____ APARATO USADO _____
OTROS DATOS: _____

CONTROL:

ANTES DEL PROCESO

DESPUES DEL PROCESO

PUREZA.....
VIABILIDAD.....

BIOQUIMICAS:

GLUCOSA.....
LACTOSA.....
H₂S.....
MANITOL.....
INDOL.....
MOVILIDAD.....
SACAROSA.....
UREA.....

(OTRAS PRUEBAS):

HUMEDAD REMANENTE.....

OBSERVACIONES:

TARJETA # 5

INFORMACION ESPECIFICA DE LA CEPA

(Cuando se entrega la cepa a quien la requiere).

Nº DE CEPA _____ NOMBRE _____ Nº DE PEDIDO _____

SUSPENDIDA EN _____ FECHA DE LIOFILIZACION _____ HUMEDAD RESIDUAL _____

VIABILIDAD (fecha de la prueba más reciente) _____

Otros datos requeridos:

REPORTO: _____

CAPITULO III

PROCESO DE LIOFILIZACIONGENERALIDADES

La liofilización es un proceso que consiste en desecar, bajo presión reducida, un producto previamente congelado, sublimando el solvente, en el caso de las soluciones acuosas. En adelante sólo consideramos el caso de las soluciones acuosas.

El procedimiento abarca diversas fases:

- Una congelación inicial a una temperatura inferior a la de temperatura de la solidificación total.
- Una desecación, digamos primaria, efectuada a una temperatura de fusión inicial. Esta desecación es lograda por sublimación a baja presión del agua congelada.
- Una desecación secundaria realizada a una temperatura inferior de desnaturalización del producto destinado a eliminar, en cierta forma el agua residual.

Al final de la operación el producto tratado conserva su forma, volumen y su estructura original, así como el

conjunto de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, protegido bajo vacío o en atmósfera de un gas inerte. Es de aspecto sólido poroso y fácilmente reconstituible por la adición de un solvente acuoso.

La liofilización, operación aparentemente simple y de la cual el principio es perfectamente comprensible, necesita sin embargo la observación de algunas reglas, sin cuyo conocimiento se obtienen resultados decepcionantes.

Veremos unos aspectos particulares de los factores que pueden influir en el desarrollo de una operación de liofilización.

LA CONGELACION

El agua se encuentra en abundancia en la mayor parte de los cuerpos naturales, ya en estado libre en los espacios intercelulares, ya absorbida a la superficie de los productos, o bien, unida a los complejos macromoleculares, donde igualmente es uno de los elementos constitutivos de las estructuras coloidales.

Hay que hacer notar igualmente, que el agua se encuentra dentro de las células vivas, disolviendo a las sales minerales y a las sustancias orgánicas y no sigue las mismas leyes de cristalización del agua que se encuentra en estado libre. Constatamos por ejemplo que el en

friamiento de una solución acarrea una evolución de la fase líquida tal, que su composición tiende hacia la -- composición eutéctica. Finalmente, la cristalización - de los coloides contenidos en las soluciones complejas - puede conducir de una manera irreversible a una ruptura del equilibrio de las fases presentes.

Así la congelación de sustancias orgánicas es a la vez operación importante y compleja a la que no siempre se le da la atención necesaria.

a).- Tiempo de Congelación

Es conveniente señalar que si a la escala de laboratorio es realmente fácil obtener tiempos de congelación - cortos, no es lo mismo cuando se trata de producción en escala industrial. En efecto, se debe contar también - con la preparación del producto, el llenado de los frascos, la carga de los aparatos, etc.

En lo que concierne a la congelación propiamente dicha - se debe considerar igualmente el poder frigorífico y el paso de calor, lo que conduce a la definición de un tiem po dado de congelación por debajo del cual es práctica- mente imposible descender.

Examinemos lo que pasa durante la congelación de un producto biológico en solución acuosa.

- Desde que el producto alcanza la temperatura de 0°C (Punto A de la curva, Fig. 1), aparecen cuerpos cristalinos es el fenómeno de la nucleación. Durante un cierto tiempo la temperatura del producto se estabi-liza alrededor de los 0°C .

- Los centros germinativos se amplían enseguida y esto corresponde a la cristalización del agua que se en-cuentra en estado libre en los espacios intercelula-res. Esta cristalización es prácticamente total - - cuando los cristales ocupan 80-90% del volumen ini-cial en el cual se encontraba el producto (Punto C - Fig. 1). En este momento el elemento activo de la - solución por liofilizar está todavía en estado líqui-do y se encuentra en el espacio intersticial. Prác-ticamente parece que los cristales de hielo se sus-penden en el producto.

- La temperatura de solidificación del elemento activo generalmente inferior a 0°C (Punto D Fig. 1). Dispo-nemos ahora de un producto sólido que presenta des-pués de la liofilización una estructura cristalina - observable a simple vista, o bien en forma de una -- costra más o menos delgada sobre la superficie del - producto.

Imaginemos ahora el mismo producto condicionado, bajo - una forma idéntica pero enfriado más lentamente, el pro

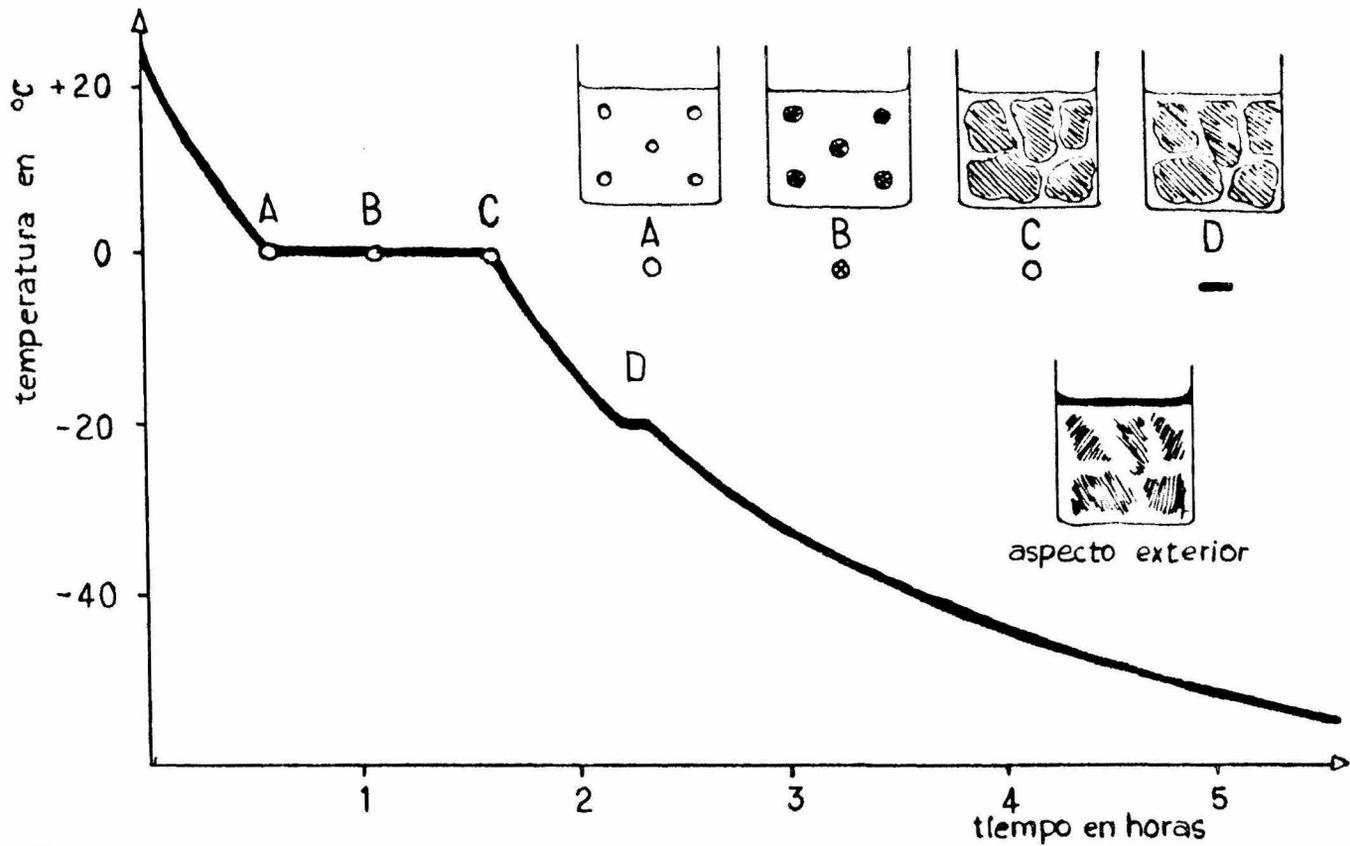


Fig 1 . CONGELACION DEL PRODUCTO: ENFRIAMIENTO NORMAL

ceso de congelación a 0°C no existe y el producto permanece líquido hasta una temperatura T_1 (B) que para aclarar la idea puede alcanzar -10°C . Se trata de un fenómeno de sobre-enfriamiento del agua (libre) fenómeno --llamado sobrefusión.

- A la temperatura T aparecen los "gérmenes" de hielo, que en el espacio de una fracción de segundo, se propagan en la totalidad de la masa del producto. El fenómeno se acompaña de cierta elevación de la temperatura hasta el valor T_2 . Se obtiene entonces una multitud de pequeños cristales, repartidos regularmente, constituidos de agua pura y ocupando el 50% de volumen inicial de la solución. Habiendo sido --dispersada la nucleación, la estructura es más fina.

En efecto, el líquido intersticial que recubre estos finos cristales constituye una red que deja mejor repartido el elemento activo en el exterior de la masa del producto. La finura de esta estructura da al producto congelado un aspecto amorfo.

- La temperatura T_3 (D) es la temperatura de solidificación total del elemento activo. Después de la liofilización la estructura amorfa, es particularmente visible y queda una pequeña capa apenas perceptible en la superficie. Esta estructura es particularmente favorable a la sublimación.

Se llega a la constatación paradójica, de que enfriamiento lento del producto puede conducir a una solidificación extremadamente rápida del agua de constitución.- Esto, es particularmente importante; en efecto, una congelación realizada en estas condiciones, es a menudo indispensable para obtener una buena liofilización de un producto.

b).- Forma de Congelar.

En el curso de la liofilización, un producto determinado se puede comportar en forma muy diferente de acuerdo al tipo de congelación al que haya sido sometido.

La congelación programada, cuyos principios fueron enunciados hace muchos años por L. Rey es actualmente una operación corriente en algunos laboratorios de investigación. Esta forma de congelación, llamada también tratamiento térmico del producto, conduce a una liofilización más rápida contribuyendo al mejoramiento de la calidad final del producto liofilizado.

Los sistemas de congelación deben entonces ser concebidos en tal forma que ofrezcan la posibilidad de tratar los productos más diversos en función del tiempo de congelación deseado y también deben tener en cuenta las múltiples formas en que los productos van a ser acondicionados para la liofilización: productos a granel, en

ampolletas o en frascos cantidad de producto por recipiente; congelación en placa y en capa.

MECANISMOS DE DAÑO EN CELULAS CONGELADAS Y LIOFILIZADAS

Sería conveniente dar algunas reglas generales para lograr una alta viabilidad, pero esto es difícil; sin embargo, hay una generalización que puede tomarse por válida: si se puede hacer sobrevivir una población celular congelándola a temperaturas por debajo de -50°C e inmediatamente recalentando hasta temperaturas normales, 25°C , ésta puede ser preservada exitosamente. Por lo tanto, el problema reside en prevenir la muerte de las células durante la congelación y durante el calentamiento subsecuente, y este es un problema que se puede solucionar tomando en cuenta varios factores:

- 1.- Encontrar la substancia protectora adecuada para hacer la suspensión celular. Entre las substancias principales usadas para este fin están: glicerol, dimetil sulfóxido, algunos polialcoholes, suero humano o animal, leche, etc.
- 2.- Controlar las variables físicas. En la congelación esto significa un estudio de la velocidad de congelación y también de la velocidad de calentamiento aunque esto último es menos frecuente.

3.- Encontrar los mecanismos físicos que se llevan a cabo en las células durante su exposición a temperaturas subcero y determinar cuales de estos mecanismos causan el daño o la muerte celular y finalmente escoger las condiciones apropiadas para prevenir los efectos letales o por lo menos minimizar los. Este último factor aunque difícil de enfocar y de llevar a cabo puede ser muy útil y tener muchas aplicaciones.

Efectos físicos que ocurren durante la Congelación.

Cuando la temperatura de una suspensión celular en medio acuoso desciende por debajo de 0°C , el medio externo permanece primeramente sin congelar, o sea "sobre enfriada", pero eventualmente comienza a congelar a una temperatura determinada por ciertos factores como el volumen de la solución, el tipo y número de agentes nu-cleantes y el tipo y concentración de solutos.

Suponiendo que tenemos una membrana intacta, puede suceder uno de dos procesos: el interior de la célula puede congelarse o el agua puede difundir a través de la membrana y congelarse en el exterior. En los dos procesos hay un incremento en la concentración de solutos internos a una temperatura dada, y con una caída de temperatura producen un incremento en la concentración de solutos tanto en el interior como en el exterior. Si esta alta concentración de solutos fuera un factor letal, --

cualquiera de los dos procesos llevaría a la muerte de las células. Por otro lado, un proceso produce hielo interno y el otro no, y seguramente la localización del hielo puede ser más crítica para la supervivencia o muerte, que la concentración de solutos.

Entonces, surge la incógnita de si habrá congelación intracelular, o pérdida de agua y depositación como hielo extracelular.

La respuesta depende de, si es más fácil y más probable que el agua difunda al exterior o que se convierta en hielo "in situ". Dicho en forma más precisa dependerá de las energías de activación comparativas para ambos procesos.

La velocidad a la cual el agua deja la célula depende de la permeabilidad de la célula al agua en su área superficial. O sea que, para una célula dada va a haber una relación inversa entre el total de agua que ha salido y la velocidad de enfriamiento. Mientras más lento sea el enfriamiento más agua habrá salido al medio externo.

El resultado neto de estas interrelaciones es que, mientras mayor sea la velocidad de enfriamiento para una célula dada, es mayor la probabilidad de congelación intracelular; y si varias células son enfriadas a la mic-

ma velocidad, es mayor la probabilidad de congelación intracelular si hay menor permeabilidad al agua y mientras menor sea el radio superficie-volumen. La primera de estas deducciones ha sido experimentalmente apoyada por algunos investigadores en algunas especies de células; o sea que un enfriamiento rápido frecuentemente presenta evidencias de cristales de hielo internos mientras que un enfriamiento lento produce células contraídas, mostrando que carecen de hielo interno.

Mecanismos de Daño en Células Congeladas.

Hay varias hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de daño en células congeladas:

- 1.- Daño por altas concentraciones de solutos.
- 2.- Daño por formación de cristales grandes.
- 3.- Daño por formación de hielo extracelular.
- 4.- Daño por formación de hielo intracelular.
- 5.- Daño por mecanismos individuales.

- 1.- Altas concentraciones de solutos. El apoyo más fuerte a esta hipótesis está dado por un estudio hecho por Lovelock y Col. en el que muestran que -

el grado de hemólisis de eritrocitos a varias temperaturas subcero puede ser imitado poniéndolos a temperaturas normales 25°C, en soluciones de NaCl que tengan la misma concentración que existiría a las temperaturas subcero dadas.

Otra forma de expresar esta hipótesis es, que la hemólisis ocurre a una concentración crítica de electrolitos y por lo tanto ocurre a la temperatura subcero a la cual se ha formado suficiente hielo para producir la concentración crítica en la solución residual aún sin congelar.

Los investigadores que apoyan esta hipótesis, concluyen además, que cualquier soluto no tóxico añadido a la suspensión dará por resultado un menor daño a una temperatura subcero dada, ya que por la presencia del soluto añadido se reducirá la concentración de electrolitos a esa temperatura.

Un segundo requisito para una solución protectora, es que sea capaz de permeabilizar las células para que así produzca la dilución requerida por los electrolitos intracelulares.

En base a esta hipótesis resultan explicables los excelentes efectos protectores del glicerol ya que no es tóxico a eritrocitos y puede penetrar en las células.

Esta hipótesis tiene dos dificultades:

- a).- Por un lado se tiende a asumir que lo que se aplica a eritrocitos, también se aplica a células en general, ejemplo, para conservar líneas celulares.
- b).- El concepto implica ciertas consecuencias lógicas que no son apoyadas experimentalmente en muchas células.

Por ejemplo, la hipótesis lleva a la predicción de que un enfriamiento rápido va a ser menos dañino que uno lento, ya que el daño por altas concentraciones de solutos es primeramente un proceso químico y por lo tanto dependiente del tiempo. En vista de que un enfriamiento rápido expone a las células a la concentración de solutos por un tiempo más corto, entonces habrá menos daño; pero generalmente sucede lo contrario, o sea que una congelación rápida es más dañina (Tabla II).

TABLA II

Efecto de la Velocidad de Enfriamiento
en la Supervivencia Celular.
(calentando a 1°C / min.)

<u>Organismo</u>	<u>Temp. Mín.</u> <u>°C</u>	<u>Vel. de En-</u> <u>friamiento</u> <u>°C / min.</u>	<u>Supervi-</u> <u>vencia %</u>
Aspergillus flavus (esporas)	-75	270	5
		0.4	38
Pasteurella tulerensis	-75	270	0.0006
		1	2
Saccharomyces cerevisiae	-30	50	0.003
		1	35

Otro concepto, el requerimiento de que un soluto debe ser capaz de penetrar la célula para poder ser protector no concuerda en muchos casos. Tomando levaduras como ejemplo (S. cerevisiae) se ve que la protección es conferida por solutos a los cuales la célula es altamente impermeable (NaCl , CaCl_2 , KH_2PO_4 , etc.). Además hay que hacer notar, que los solutos en estos medios -- protectores son los mismos electrolitos que están implicados como agentes letales en la hipótesis de concentración de solutos, y protegen a la célula a pesar del hecho de que extraen por ósmosis agua intracelular y así producen un considerable aumento en la concentración de solutos intracelulares aún antes de haber comenzado la congelación.

También hay varios ejemplos de protección por compuestos de alto peso molecular que lógicamente son incapaces de penetrar en la célula. De hecho, compuestos de este tipo como polivinil pirrolidona y poliglicoles protegen eritrocitos, o sea las mismas células sobre las cuales se hizo la hipótesis originalmente.

2.- Formación de cristales. Es bien sabido que el tamaño de los cristales decrece al incrementarse la velocidad de enfriamiento; sin embargo, los cristales pequeños pueden crecer durante el almacenamiento a temperaturas arriba de -100°C y durante el ca

lentamiento. Los cristales incompletos pueden --
cristalizarse por completo (devitrificación) y pue--
den crecer cristales mayores a expensas de los me--
nores (recristalización). Además, la forma y pro--
piedades de los cristales de hielo pueden ser afec--
tadas por estos mismos factores, así como por la --
naturaleza de los solutos en una solución.

Estos cambios se han visto en sistemas no vivos, como --
agua pura y soluciones acuosas; presumiblemente, estos--
cambios ocurren también en células vivas, pero la forma
en que afectan la supervivencia es un asunto de especu--
lación más que de hecho, pero sí se puede asegurar que--
la forma y tamaño de los cristales influyen en cierta --
forma sobre la supervivencia celular. Por ejemplo, un--
rápido calentamiento minimiza el crecimiento de los cris--
tales por recristalización o devitrificación y también--
tiende a dar por resultado una mayor supervivencia.

3.- Formación de hielo extracelular. El incremento --
del 10% en volumen que resulta de la conversión de --
agua a hielo puede producir el aplastamiento de --
las células, pero las evidencias están en contra --
de esta suposición ya que muchas células especial--
mente microorganismos pueden de hecho sobrevivir --
la solidificación del medio externo sin sufrir da--
ño.

4.- Formación de hielo intracelular. Según esta hipótesis el daño es producido por formación de hielo intracelular, lo que lleva a ciertas predicciones: - los factores que reducen la probabilidad de congelación intracelular reducirán por ende, el daño celular.

Antes se mencionó, que una congelación lenta reducirá la probabilidad de formación de hielo dentro de la célula, por lo tanto, la hipótesis predice que un enfriamiento lento reducirá el daño y esto en realidad sucede en muchos casos (como se ve en la Tabla II).

Otra observación que resulta de esta hipótesis es que si se deshidratan parcialmente las células antes de empezar el enfriamiento, les tomará menos tiempo durante el enfriamiento para alcanzar un contenido de agua suficientemente bajo para prevenir la congelación, que el tiempo que les tomaría a células completamente hidratadas. Por lo tanto, de acuerdo a esto, el por ciento de células que sobrevivan a cierta velocidad de enfriamiento, será más alto para las células parcialmente deshidratadas.

5.- Mecanismos individuales. Es bastante probable que ciertos mecanismos contribuyan independientemente para dañar a una célula dada. Más aún, si cierto mecanismo daña a una especie de células, esto no -

explica necesariamente el daño en otras células, aunque estén estrechamente relacionadas taxonómicamente. También puede ser que en cada tipo de células, el daño sea producido por alguna de las causas de las cuatro hipótesis mencionadas o por otras no mencionadas.

A pesar de estas complicaciones, es de considerable valor estudiar a fondo los mecanismos de daño; supongamos por ejemplo que se quiere congelar una célula que según se ha demostrado es altamente sensitiva a la concentración de solutos intra y extracelulares o a la deshidratación parcial, entonces se puede suponer que la supervivencia o muerte de estas células va a estar determinada primeramente por los aspectos de concentración de solutos de la congelación; por lo tanto, la velocidad de enfriamiento, el medio de suspensión y otras variables pueden ser evaluadas en términos de las predicciones de dicha hipótesis. Por otro lado, suponiendo que tenemos que preservar una célula que es resistente a cambios en el contenido de agua, supondremos que se puede lograr más supervivencia seleccionando las condiciones necesarias para minimizar la posibilidad de formación de hielo interno.

Claro que las suposiciones pueden ser erróneas, porque al evitar algún mecanismo de daño, se puede estar promoviendo algún otro, o porque el mecanismo que causa la muerte celular no es el que se suponía. Sin embargo, de

ben seguirse estudiando los mecanismos de daño durante la congelación para lograr mejores condiciones para preservar células.

LA LIOFILIZACION

La sublimación. Sabemos que la sublimación de un sólido es la transformación directa de este cuerpo al estado de vapor, sin pasar por el estado líquido.

Congelación vs. Liofilización. Como es sabido, para llevar a cabo el proceso de liofilización es necesario congelar primero el producto. Después se hace una subsecuente sublimación que sirve para remover el hielo del sistema.

La sublimación tiene menos probabilidad de causar daño que la deshidratación inicial producida por la congelación. Según esto, si hay supervivencia alta después de congelar, también habrá después de liofilizar. Y en realidad así sucede en muchos casos

Sin embargo, esta correlación no es correcta en todos los casos: frecuentemente, se tiene un alto por ciento de células viables después de la congelación, mientras que persisten muy pocas o ninguna después de la liofilización. De aquí se deduce que en los pasos subsecuentes a la congelación también existen mecanismos de daño

celular adicionales que pueden ser:

a).- Contenido final de agua.

En la liofilización, las células son mantenidas a temperaturas relativamente altas durante la sublimación y usualmente alcanzan la temperatura ambiente durante las fases finales del secado. Debido a la gran diferencia de temperatura entre las células y la trampa de vapor, las células liofilizadas alcanzarán un contenido de agua considerablemente menor en un período de tiempo dado que células en suspensiones congeladas a temperaturas menores, y este bajo contenido de agua puede ser letal.

b).- Almacenamiento.

Las células liofilizadas son mantenidas usualmente a temperaturas arriba de 0°C ; aunque estas células no contienen el agua suficiente para llevar a cabo muchas reacciones bioquímicas, otras aparentemente sí pueden ocurrir y con ello producir paulatinamente una pérdida de viabilidad. Por otro lado, cuando las células son almacenadas a temperaturas tan bajas como -196°C , no ocurre ninguna reacción bioquímica.

c).- Rehidratación vs. derretimiento (deshielo).

Son procesos análogos en el hecho de que ambos dan por resultado agua en forma aprovechable nuevamente por las células. Sin embargo, difieren en la velocidad a la cual el agua se hace aprovechable y en la temperatura a la que ocurren; por esto -- van a afectar diferentemente la supervivencia.

Desafortunadamente, no conocemos bien los mecanismos del daño que ocurren en cada caso.

A pesar de estas diferencias entre liofilización-rehidratación y congelación-derretimiento, el acto de congelar es un factor común a ambos procesos y ninguna célula sobrevivirá el derretimiento o la rehidratación si no ha sobrevivido la congelación inicial. De acuerdo a esto, mientras mejor se entiendan los mecanismos que operan en las células durante la formación de hielo, habrá más posibilidad de encontrar métodos exitosos para preservar la viabilidad y las propiedades de diversas células.

EL VACIO

Presión dentro de la cámara.- La sublimación de un cuerpo determinado sólo puede producirse cuando la presión de la cámara sea inferior a la que corresponde al punto triple.

LA DESECACION SECUNDARIA

Al fin de la fase de sublimación, todo el hielo desaparece y la temperatura del producto tiende a subir para igualar la temperatura. La humedad residual se estima entre el 1 al 2%.

La experiencia demuestra que para la mayor parte de los productos biológicos, incluyendo microorganismos en general, es deseable una humedad residual baja.

En efecto, si el contenido en agua es alto, los microorganismos se desnaturalizan con el tiempo. Es pues necesario efectuar una desecación que se ha denominado secundaria.

La conducta de esta operación es delicada; una prolongación de la desecación secundaria que conduzca a un contenido en agua inferior al valor previsto, puede acarrear una degradación de los elementos activos de los microorganismos.

El valor óptimo de la humedad residual deberá pues ser definido con anterioridad para un producto dado, en nuestro caso el 1%; dicho en otra forma, las condiciones de desecación secundaria serán determinadas experimentalmente (presión, temperatura, tiempo).

No es indispensable ni deseable, mantener una presión muy baja. Por lo regular una presión de 10^{-2} Torr con-

viene en la mayoría de los casos. Por abajo de este valor, la desecación presenta un sesgo asintótico y casi no progresa (Fig. 2). Por otro lado, los fenómenos de retrodifusión del aceite pueden ser muy importantes y contaminar los productos. Por consiguiente, una temperatura de la trampa de -65°C , puede ser suficiente.

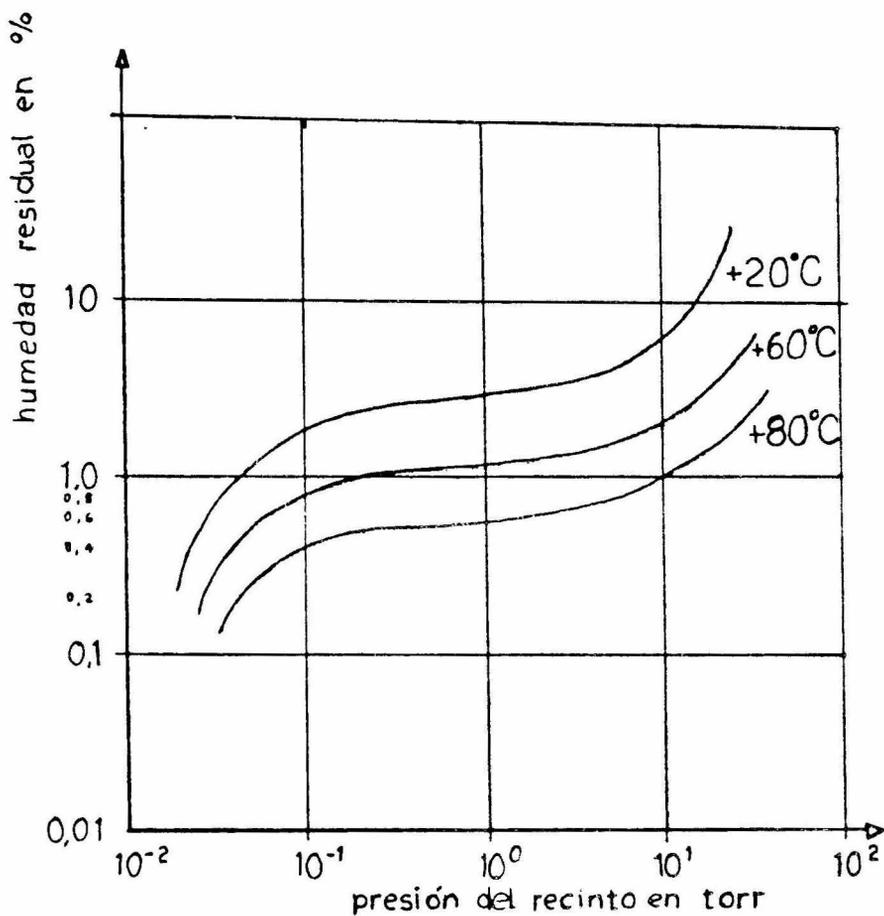


Fig. 2 HUMEDAD RESIDUAL DE LECHE ENTERA LIOFILIZADA EN FUNCION DE LA PRESION DENTRO DEL RECINTO Y DE LA TEMPERATURA DEL PRODUCTO.

CAPITULO IV

ESTUDIO DE LAS CEPAS MICROBIANAS POR LIOFILIZAR:

BACTERIAS Y HONGOS

Como sería imposible detallar todas las características de cada uno de los organismos estudiados en este trabajo, tomaremos sólomente un modelo de bacterias y de hongos.

BACTERIAS: SALMONELLA TYPHI

Pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae.

Género: Salmonella lignières.

Especie: Salmonella typhi.

Sinonimia.- Salmonella typhosa, Bacterium typhosum, Bacillus typhosus, Bacillus typhi, Bacillus typhi abdominalis, Bacterium typhi, Bacterium (Eberthella) typhi, - Salmonella typhi.

Morfología.- Bacilos de 0.6 a 0.7 por 2.0 a 3.0 micras, se presentan aislados en pares y asociaciones en cadenas cortas. Móviles debido a flagelos peritricos, en ocasiones son inmóviles.

Tinción.- Son Gram negativos.

Cultivos.- Formación de Colonias.- Colonias en gelatina.- grisáceas, transparentes a opacas, con marcas superficiales en forma de hoja.

Siembra por piquete en gelatina.- Formación de una capa delgada, blanca, crecimiento opalescente, no hay licuefacción.

Colonias en agar.- Grisáceas, transparentes a opacas.

Colonias en agar inclinado.- Blancas a grisáceas, crecimiento ondulado.

Caldo líquido.- Turbidez, un sedimento escaso, forma una película delgada en cultivos viejos.

Medio de leche tornasolada.- Ligera acidez seguida de un regreso a pH neutro o ligeramente alcalino.

Medio de papa.- Crecimiento húmedo diseminado por toda la superficie.

Bioquímicas.-

Indol	-
H ₂ S	+
Glucosa	A
Maltosa	A
Sorbitol	A
Trihalosa	A
Marcitol	A

Arabinosa	+	
	-	
Dulcitol	+	
	-	
Xilosa	+	
	-	
Inositol	+	
	-	
d-tartrato	+	
	-	
Lactosa	-	
Sacarosa	-	
Salicina	-	
Adonitol	-	
Ramnosa	-	
l-tartrato	-	
dl-tartrato	-	
Reducción de nitratos		+
Citrato de sodio		+
		-
Temperatura óptima:	37°C	
Aerobio	0	anaerobio facultativo.

HONGOS: CANDIDA ALBICANS

Sinonimia.- *Oidium albicans* , *Monilia albicans* , *Endomyces albicans* , *Mycotoruloides triadis* , *Monilia aldoi*.

Morfología.- *C. albicans* es un hongo pequeño tipo levadura, oval, de 2.5 x 4.0 micras y de pared delgada. Desarrolla un pseudomicelio por alargamiento de células que no llegan a -

desprenderse.

Tinción.- Son Gram positivos.

Cultivos.- Formación de Colonias.-

Agar glucosado de Sabouraud.- Desarrolla rápidamente (24-48 hs) a temperatura ambiente o a 28°C, formando colonias de tamaño medio, lisas, pastosas y con característico olor a moho. Las mas fijadas pueden ser alveoladas en el centro y forman surcos radiales.

Agar eosina-azul de metileno de Levine.- Incubadas a 37°C y con atmósfera de 10% de CO₂ forman colonias filamentosas distintas a los 2 días de sembradas en estría;; se observa una orla micelial radiante con objetivo de poco aumento.

Agar sangre.- Colonias de tamaño medio y de color gris mate.

Agar harina de maiz o agar harina de maiz + polisorbato 80 o crema de arroz agar + polisorbato 80 o agar clamidospora de Difco.- Forma micelios ramificados de tipo arbóreo con la presencia de clamidosporas (otras especies de Candida, no forman clamidosporas en estos medios)

Prueba adicional para diferenciar C. albicans de otras especies.-

Forma "tubos germinales" o "brotes germinativos" si se inocula en medios líquidos como tioglicolato, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, albúmina de huevo y albúmina-Ac. oléico. Se hace un análisis microscópico 4 horas después de la inoculación buscando los "brotes germinativos que son alargamientos de las células.

Caldo glucosado de Sabouraud.-No hay desarrollo en la superficie.

Reacciones bioquímicas de fermentación de azúcares.-

Glucosa A G

Maltosa A G

Sacarosa A

Lactosa - -

Nota: Las fermentaciones suelen ser irregulares, a menos que se vigilen cuidadosamente las condiciones.

CAPITULO V

MATERIAL Y METODOS

Como es imposible describir todas y cada una de las pruebas-realizadas para cada microorganismo ya que en teoría parecen iguales, en la práctica se han encontrado diferentes en su -trato; por lo tanto, tomaremos como ejemplo los trabajos rea-lizados con S. typhi, debido a que ésta presenta caracterís-ticas semejantes a muchas otras.

I. PRUEBAS ANTES DE LA LIOFILIZACIONMETODO A.- Prueba de Pureza.

1.- Material y equipo requerido:

- a).- Portaobjetos
- b).- Asa de platino
- c).- Mechero
- d).- Microscopio
- e).- Campana para área estéril

2.- Reactivos:

- a).- Colorantes para la tinción de Gram (cristal -violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina).
- b).- Solución salina isotónica
- c).- Aceite de inmersión

3.- Técnica:

- a).- Se hace un frotis del desarrollo
- b).- Se fija el frotis al calor

c).- Se tiñe por el método de Gram.

d).- Se observa con objetivo de inmersión.

4.- Interpretación :

Se observan bacilos Gram negativos si la cepa es pura, siguiéndose las demás pruebas en caso de contaminación, se procede a aislar el germen y se verifica la pureza.

METODO B.- Prueba de Movilidad.

1.- Material:

a).- Portaobjetos excavado

b).- Cubreobjetos

c).- Asa de siembra

d).- Microscopio

2.- Reactivos:

a).- Solución salina estéril

b).- Vaselina sólida

3.- Técnica:

a).- Colocar una gota de solución salina sobre un cubreobjetos limpio y desengrasado.

b).- Con el asa, tomar una porción pequeña del desarrollo y mezclarla con la gota de soluc. hasta tener una suspensión homogénea.

c).- Colocar una capa fina de vaselina sólida alrededor de la excavación de un cubreobjetos limpio y desengrasado.

d).- Con mucho cuidado, invertir el cubreobjetos y colocarlo

sobre la excavación del portaobjetos de manera que la gota quede suspendida en el portaobjetos

e).-Se observa al microscopio a diferentes aumentos y con poca luz.

4.- Interpretación:

Movilidad negativa o positiva.

METODO C.- Reacciones Bioquímicas.

1.- Material:

- a).- Cajas Petri
- b).- Tubos de cultivo
- c).- Asa de cultivo
- d).- Incubadora a 37°C

2.- Medios:

Gelosa simple

Medios para bioquímicas:

gelatina (inclinada y en piquete)

agar (inclinado y en piquete)

caldo simple

leche tornasolada

extracto de papa

caldo adicionado de púrpura de bromocresol --

(indicador) en tubos de fermentación con los-
siguientes azúcares:

glucosa	rafinosa
levulosa	dextrina
galactosa	glicerol
xilosa	manitol
maltosa	sorbitol

agua peptonada, reactivo de Ehrlich (prueba -
para indol)

caldo nitrado (prueba de reducción)

agar acetato de plomo (producción de H₂S)

3.- Técnica:

- a).- Sembrar la cepa en gelosa simple e incubar a 37°C durante 48 hrs. Una vez obtenido el crecimiento se observa el tamaño y pigmentación de las colonias, anotándose todas las características en la Tarjeta # 1.
- b).- De estas colonias se inoculan los diferentes medios para reacciones bioquímicas. Se incuba a 37°C durante 48 hrs. Se observan los tubos y se anotan resultados.

4.- Interpretación:

(Ver Capítulo IV).

METODO D.- Cuenta de gérmenes viables.

Se realiza sobre la suspensión en leche, después de la cosecha y antes de congelar.

1.- Material:

- a).- Cajas Petri
- b).- Tubos
- c).- Pipetas
- d).- Cuenta colonias
- e).- Incubadora a 37°C
- f).- Cepa en estudio
- g).- Asa de siembra

2.- Reactivos:

- a).- Gelosa simple

b).- Solución salina estéril

c).- Leche Difco al 10% para la suspensión microbiana (esterilizada en autoclave a 10 lbs- 110°C - 10 min)

3.- Técnica:

a).- Al obtener la suspensión para liofilizar, se toman alicuotas de cada tubo y se reúnen en uno solo. De aquí se toman 0.5 ml y se pasan a un tubo con 4.5 ml de solución salina para obtener una dilución 1:10; de aquí pasamos 1 ml a otro tubo con 9 ml de solución salina estéril (1:100), y así sucesivamente hasta obtener diluciones de 10^{-9} .

b).-De las tres diluciones mas altas (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}), se siembran 5 cajas Petri colocando 1 ml de cada dilución. Se adicionan 20 ml de gelosa simple fundida y a una temperatura de 40°C agitando en forma rotatoria para que se mezcle bien la suspensión con el medio. Se incuban a 37°C durante 48 hrs colocando las cajas invertidas.

c).-Se hace la cuenta de gérmenes en el cuentacolonias, obteniéndose un promedio de colonias por cada dilución. El promedio multiplicado por la dilución hecha, da por resultado la viabilidad o sea el N° de microorganismos por ml. El promedio de las 3 diluciones mas altas, da el total de gérmenes viables.

DESCRIPCION DEL APARATO USADO EN LA LIOFILIZACION

Modelo USIFROID: MS. 12. MONO 110 V.

Características.-

<u>CAPACIDAD:</u>	12 ampolletas o frascos tipo penicilina.
<u>CONDENSACION:</u>	<p><u>Por hielo seco</u></p> <p>Congelación del condensador 0.500 Kg.</p> <p>Condensación: 8g por gramo de hielo seco.</p> <p>Este aparato puede ser alimentado con pedazos de -- hielo seco fabricado a -- partir de gas carbónico - líquido.</p> <p><u>Con nitrógeno líquido</u></p> <p>Colocándolo directamente en el condensador.</p>
<u>CALENTAMIENTO:</u>	Por el aire del ambiente.
<u>CONTROL:</u>	Por el tubo indicador de vacío.
<u>CONEXION AL VACIO:</u>	Las ampolletas se conectan - directamente a los tubos de la cuba.
<u>RUPTURA DEL VACIO:</u>	Por aire filtrado o un gas - neutro a los frascos o ampolletas.
<u>ESTERILIZACION:</u>	La cuba y el condensador ensamblados son fácilmente desmontables y se esterilizan - al autoclave.

BOMBA DE VACIO:

Rotativa de aspas de dos - -
tiempos con un dispositivo -
para la generación del acei-
te.

Capacidad $3\text{m}^3/\text{h}$.

ALIMENTACION ELECTRICA:

Corriente alterna 50 Hz, 110
V ó 220 V.

Protección por desconexión y
fusible.

POTENCIA:

Motor, 1/4 de CV.

Accesorios: 50 VA.

PESO:

47 Kg.

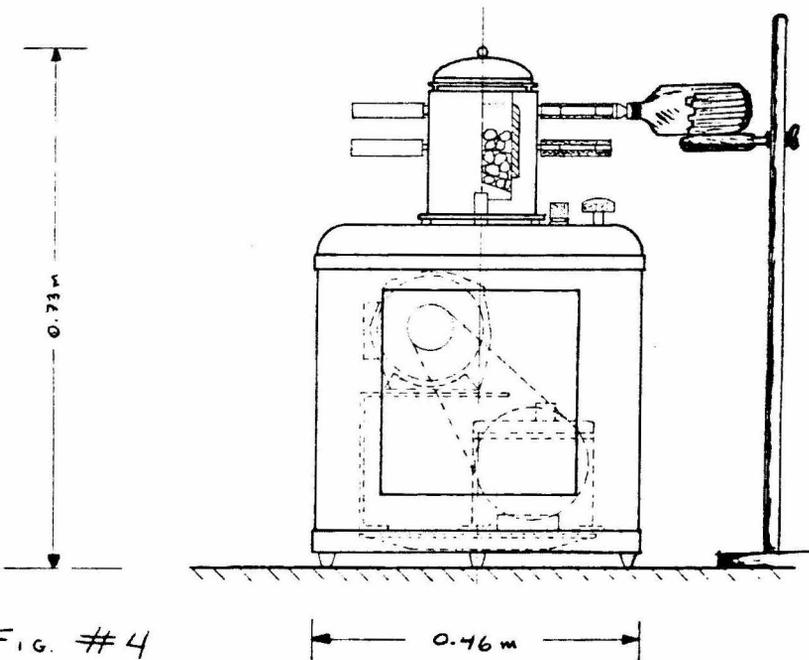


Fig. #4

II. PROCESO DE LIOFILIZACION

1.- Material y Equipo:

- a).- Máquina liofilizadora
- b).- Equipo para cerrado de tubos (soplete y tanques)
- c).- Probador de vacío
- d).- Desecador con CaCl_2
- e).- Tubos para liofilización
- f).- Frascos de centrífuga con tapones de hule
- g).- Pipetas graduadas y capilares
- h).- Gasa, algodón, tijeras y etiquetas

2.- Reactivos:

- a).- Alcohol etílico
- b).- Hielo seco
- c).- Solución Fenolada al 5%

3.- Técnica:

- a).- Etiquetado de tubos.- Se cortan pequeñas tiras de papel Bond de aproximadamente 4.0 por 0.5 cm y en ellas se anota con lápiz plomo el nombre y número de la cepa por un lado y el número y fecha de liofilización por el otro.- Debe dejarse una tercera parte de la etiqueta sin escribir. Se introducen las etiquetas en los tubos de liofilización, con la zona sin escribir hacia el fondo y a continuación se tapan con algodón y gasa, procurando que no queden los tapones ni muy flojos ni muy apretados. Los tubos se esterilizan en autoclave a 15 lb, 120°C, 15 min.

- b).- Cosecha de microorganismos.- La suspensión microbiana se hace tomando un tubo con desarrollo y agregando 3 ml de leche al 10% estéril y con el asa se desprende el desarrollo agitando el tubo para tener una buena suspensión.
- c).- Llenado de tubos.- Se colocan en cada tubo, con una pipeta capilar 0.3-0.4 de la suspensión microbiana trabajando en condiciones estériles. Es importante que el líquido no toque las paredes del tubo, o sea que debe caer directamente al fondo porque al cerrar los tubos al final del proceso, se carboniza lo que haya quedado adherido a las paredes, dando mal aspecto. Después de haber llenado los tubos, se cortan los tapones con tijeras al ras de la boca del tubo, con el objeto de facilitar la acción del vacío en el proceso de liofilización.
- d).- Congelación.- Los tubos etiquetados y llenos, se meten en frascos de centrifuga (12-15 tubos en cada frasco) y se colocan en una mezcla de hielo seco y alcohol para lograr una congelación rápida.
- Nota.-En algunos casos se recomienda una congelación lenta, para lo cual los tubos se dejan en un congelador común (-15 a -20°C) durante una noche.
- e).- Adaptación de los frascos a la liofilizadora.- Los frascos se tapan con un tapón de hule horadado, que lleva una pequeña conexión de tubo de vidrio, la cual se conecta directamente a las mangueras del condensador de la máquina. (Fig # 4).

- e).- Tiempo y temperatura de liofilización.- Antes de conectar los frascos a la máquina, ésta se deja funcionando durante 15 a 20 min., con el objeto de calentarla y así lograr un vacío adecuado, el cual se verifica con el tubo indicador de vacío que está integrado al aparato. El condensador de la máquina debe tener constantemente hielo seco y alcohol para mantener la temperatura adecuada, la cual se ha visto que oscila entre los -50 y los -60°C. Una vez pasado el tiempo de liofilización, que en este caso es de 7 a 8 horas, se rompe el vacío lentamente para evitar que sean succionados los tapones de los tubos.
- f).- Cerrado de tubos.- Terminado el proceso de liofilización en sí, los tubos se colocan en un desecador para evitar la entrada de humedad ambiental; a continuación se va cerrando cada tubo conectándolo a una manguera larga que a su vez está conectada a la bomba de vacío de la liofilizadora, con el objeto de succionar el aire que puede haber en el tubo. Se deja funcionar el vacío alrededor de un minuto y se procede a cerrar los tubos con un soplete común, de gas y oxígeno o acetileno y oxígeno; inmediatamente se presiona ligeramente la punta contra una superficie plana para que quede hacia adentro. Los tubos se cierran

a una altura de aproximadamente 3/4 partes, - cuidando que no se quemee la etiqueta.

Ya enfriados los tubos, se verifica que estén bien sellados, introduciéndolos en una solución de fenol; aquellas ampollitas en que entre el líquido, se deshechan ya que no están bien selladas.

Las ampollitas que hayan pasado la prueba, se ordenan debidamente y se refrigeran a 2 - 6°C.

III. PRUEBAS DE CONTROL POSTERIORES AL PROCESO DE LIOFILIZACION

METODO E.- Determinación de Humedad. Técnica de Karl-Fischer.

1.- Material y equipo:

a).- Aparato de Karl-Fischer

2.- Reactivos:

a).- Soluciones A y B de Karl-Fischer

3.- Fundamento:

El yodo reacciona con dióxido de azufre, en presencia de agua del siguiente modo:



Este principio, descubierto por Bunsen, fue aprovechado por Karl y Fischer para desarrollar un método que permite determinar con exactitud y rapidez pequeñas cantidades de agua. Karl-Fischer utilizó me

tanol como disolvente del yodo y del dióxido de azufre, y agregó piridina a fin de desviar a la derecha el equilibrio de la reacción redox (óxido-reducción). Más tarde, Smith, Bryant y Mitchell comprobaron que en la reacción tomar parte la piridina y el metanol, de la siguiente forma:



4.- Técnica: (Método volumétrico).

Se ponen 2.5 ml de metanol en el matraz de valoración y se añade reactivo de K-F hasta el punto final; se prescinde del volumen consumido pues no entra en el cálculo. Se pesa o mide la muestra en cantidad que contenga de 10 a 50 mg de agua y se vacía rápidamente en el matraz. Se agita vigorosamente y se valora de nuevo con el reactivo de K-F. El contenido de agua de la muestra es de $S \times F$ mg donde:

S = Volumen de reactivo usado para la valoración de la muestra

F = Factor de equivalencia de agua definida anteriormente.

METODO F.- Rehidratación de Cepas Liofilizadas.

1.- Material:

- a).- Pipeta capilar
- b).- Pinzas y segueta para ampollitas
- c).- Compresas estériles de gasa y algodón.

2.- Reactivos:

- a).- solución salina estéril o caldo nutritivo estéril.
- b).- solución fenolada al 5%.

3.- Técnica:

a).- Las ampollitas se marcan con una sierra de ampollitas (sin romper) en el lugar en que se van a abrir, a 1-1.5 cm de la punta.

b).- Se dejan media hora en la solución fenolada y pasado este tiempo se sacan con unas pinzas y se envuelven en una compresa de algodón y gasa estéril, se rompen y mediante la pipeta capilar se agrega al polvo contenido en la ampollita de 0.3 a 0.5 ml de solución salina o caldo estéril y con la misma pipeta, se homogeneiza y se siembra en gelosa simple.

c).- Cuenta de gérmenes viables.:

Se toman aproximadamente 10 ampollitas del lote liofilizado y se rehidratan como se describió antes, con solución salina isotónica estéril o con caldo estéril de manera que la cantidad agregada llegue hasta el nivel de la ampollita donde estaba contenida originalmente la suspensión de leche antes del secado, lo cual es fácil de observar.

Se homogeneiza perfectamente el contenido de cada ampollita y se pasan a un tubo estéril donde se reúne el contenido de las 10.

Se procede a hacer la cuenta de gérmenes viables como se describió en el método D.

d).- El medio sembrado, se incuba 48 hrs. a 37°C y de las colonias obtenidas se hacen las pruebas de pureza, movilidad y reacciones bioquímicas (Métodos A, B y C).

CONCLUSIONES

- 1.- Es preciso contar con una Colección de Cepas en la Facultad de Química de la UNAM , ya que actualmente la obtención y conservación de las cepas empleadas en las prácticas constituye un problema para la mayoría de los profesores.
- 2.- De toda la literatura usada se concluye que la liofilización es un método adecuado para la conservación de la mayor parte de microorganismos que se utilizarán en la Colección de Cepas.
- 3.- Los procedimientos de control proyectados, resultan aplicables a casi todos los microorganismos, a pesar de las grandes diferencias que puede haber en sus características.
- 4.- Se dará a los alumnos la oportunidad de realizar su Servicio social dentro de la Colección de Cepas.
- 5.- Este trabajo provee material para futuros estudios que podrán ser realizados en base a una colección organizada de cepas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexopoulos J.C. 1962 . " Introducción a la Micología " . 2^a Ed.
Editorial Universitaria de Buenos Aires . ARGENTINA.
- 2.- American Type Culture Collection . 1964 . " Catalogue of Cultures "
7th Ed. Maryland, U.S.A.
- 3.- Amoignon J. y L. Le Floch . 1970 . " Principios Generales de la
Liofilización de Productos Biológicos y Farmacéuticos " . 1^a Ed.
Sociedad Usifroid . París, FRANCIA.
- 4.- Conant F.N., D.T. Smith , R.D. Baker y J.L. Callaway . 1972.
" Manual de Micología Clínica " . 3^a Ed. , Ed. Interamericana.
México D.F., MEXICO.
- 5.- Edwards P.R. and W.H. Erving . 1962 . " Identification of Entero-
bacteriaceae " . 2nd Ed. Ed. Minneapolis Burgess Publishing Co.
Minneapolis Minn. , U.S.A.
- 6.- Flosdorff E.W. 1949 . " Freeze-Drying " 1st Ed. , Reinhold Pu-
blishing Co. New York, U.S.A.
- 7.- Hesseltine, C.W. , J.R. Bradle and R.C. Benjamin. 1960 .
" Further investigations on the preservation of molds "
Myc. 25: 762-774
- 8.- Jawetz E. , J.L. Melnick. , and M.E. Adelberg. 1965 . " Manual
de Microbiología Médica " 2^a Ed. , Ed. El Manual Moderno . MEXICO.
- 9.- Martin W.E. , E.F. Cook y E.L. Emerson. 1961 . " Farmacia Prác-
tica de Remington " , 2^a Ed. , Ed. U.T.E.H.A. Bs. As., ARGENTINA.
- 10.-Mazur P.I. 1973 . " Mechanisms of injury in frozen and dried
cells " , Proceedings of the Specialists Conference on Culture
Collections, Ottawa, August 1962. , Ed. University of Toronto Press
CANADA

- 11.- Peltier L.G. , 1946 . " Laboratory manual of General Bacteriology"
1st Ed. , John Wiley and Sons Inc. London, ENGLAND.
- 12.- Raper B.K. , 1963 . " General Methods of Preserving Cultures "
Proceedings of the specialists Conference on Culture Collections,
Ottawa, August, 1962 . , Ed. University of Toronto Press. CANADA
- 13.- Rey L. 1960 . , " Traite de Lyophilisation" 2nd Ed. , Ed. Herman
París, FRANCIA.
- 14.- Roberts B. , E.G.A. Murray. , N.R. Smith. , 1957 . , " Bergey's
Manual of Determinative Bacteriology " 7th Ed. , Williams and
Wilkins Co. U.S.A.
- 15.- Salle A.J. 1961. , " Laboratory Manual on Fundamental Principles
of Bacteriology " 2nd Ed. Mc Graw-Hill Book Co., Inc. U.S.A.
- 16.- Shewan J.M. , 1963. " The organization of a type Culture Collec-
tion " , Proceedings of the Specialists Conference on Culture
Collections, Ottawa, August 1962. , Ed. University of Toronto
Press, CANADA
- 17.- Smith T.D. y N.F. Conant. , 1971 . , " Microbiología de Zinsser "
4^a Ed. , Ed. U.T.E.H.A. México D.F. , MEXICO.
- 18.- Tsuchiya T. 1961 . , " Studies on Candidiasis in Japan "
Research Committee of Candidiasis. Tokio JAPAN.
- 19.- Van Beverwijk A.L. , 1963 . , " Culture Collections, Why and
Wherefore " . , Proceedings of the Specialists Conference on
Culture Collections, Ottawa, August 1962. , Ed. University of
Toronto Press. CANADA.