

Trabajo de Revisión

Toxicología Experimental

Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola¹, Luis Alfredo Rosario Fernández².

¹ Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia,

² Licenciado en Microbiología.

Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado

Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

En los estudios de genotoxicidad potencial de una sustancia se deben incluir ensayos que permitan detectar daño genético, tanto cromosómico como génico, en células somáticas y germinales, para lo cual existen métodos "in vitro" estandarizados en microorganismos. En el ensayo de ames se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas. La mayor dificultad del trabajo con estas cepas es la disminución de la calidad en cuanto a la pérdida total o parcial de los marcadores fenotípicos, por ser susceptibles a los cambios de temperatura. El objetivo de este trabajo es profundizar sobre el tema de cómo conservar estas cepas eficientemente, siendo evaluadas mediante las pruebas fenotípicas como parámetro de calidad del proceso. Se hace alusión a los métodos generales de conservación, utilidad del ensayo de ames, evaluaciones a incluir en las pruebas fenotípicas y su utilidad para definir el método más eficaz de conservación. Los métodos más eficaces de conservación lo constituyen la liofilización en primer lugar y la congelación a -80 °C como método alternativo para un corto periodo de tiempo, las pruebas fenotípicas utilizadas como parámetros de calidad nos permiten definir cual es el método ideal de conservación. Bajo nuestras condiciones experimentales, para el caso de las cepas TA 98, 100 y 102 evaluadas durante 3 años, el mejor método de conservación es la liofilización con mantenimiento a 4°C, sin modificaciones significativas en el efecto mutación *his* y la frecuencia espontánea de reversiones.

Palabras clave: Conservar, *Salmonella typhimurium*, ensayo de ames, pruebas fenotípicas, TA 98, TA 100, TA 102.

Abstract

Conservation Methods of *Salmonella typhimurium* strains used in the Ames test.

The genotoxicity potential studies of a substance should include the assays that allow detecting genetic, Chromosomal and genic damage, in somatic and germinal cells, for that which exist *in vitro* standardized methods in microorganisms. Ames test are used *Salmonella typhimurium* strains, built by genetic engineering, able to detect compound that cause genics mutations. The biggest problems in the strains work is the quality decrease of the total or partial loss of the phenotypic markers, to be susceptible to the temperature changes. The aim of this work is to deepen on the topic of how to conserve these strains efficiently, being evaluated by means of the phenotypic tests like parameter of process quality. We made allusion about general methods of conservation, ames test utility, evaluations that to include in the phenotypic tests and it's utility to define the most effective conservation method. We conclude that the most effective conservation methods constitute in the first place the lyophilization and the -80 °C freezing like alternative method for a short time period, the phenotypic tests used as parameters of quality allow to be defined which is the ideal conservation method. Under our experimental conditions, in TA 98, 100 and 102 strains evaluated during 3 years, the best conservation method is the lyophilization with maintenance at 4°C, without significant modifications in *his* mutation effect and spontaneous reversions frequency.

Key words: Conserve, *Salmonella typhimurium*, ames test, fenotipic tests, TA 98, TA 100, TA 102.

Introducción

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en los diferentes sectores.¹ Estos necesitan ser viables al menos durante el estudio y los experimentos, para lo cual deberán ser mantenidos y conservados en una colección de cultivos microbianos garantizando su disponibilidad.²

Los objetivos del trabajo con microorganismos pueden ser variados, y pueden incluir investigaciones medioambientales, taxonómicas, agrícolas y biomédicas e industrial.^{3, 4} La conservación *ex situ* de todos los microorganismos aislados, estudiados y reportados en la literatura científica, es fundamental para el progreso de la ciencia. Sin esto, los científicos necesitarían llevar a cabo constantemente el costoso proceso de caracterización e identificación al inicio de cada nuevo estudio.⁵

Los cultivos de microorganismos con determinadas características son esenciales para la mayoría de los ensayos microbiológicos. Los cultivos de referencia o controles de alta calidad son utilizados en un amplio número de determinaciones. Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio.⁴ Los microorganismos tienen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, mantenerlos viables y genéticamente estables.

La conservación ha de estar encaminada al mantenimiento de las cepas altamente productivas durante largos periodos de tiempo sin que se produzcan cambios fenotípicos, especialmente en las características relacionadas con la producción de los metabolitos secundarios de interés.⁶

Se han establecido varios métodos de preservación con los cuales se trata de mantener el cultivo viable y con un mínimo de cambios genéticos, lo más cercano posible al aislamiento original. La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación; o por combinación de ambos.⁷

Debido al alto costo de las cepas de referencia y de los equipos utilizados en la conservación de microorganismos es necesario que cada laboratorio entrene a su

personal para desarrollar sus propias colecciones de forma que estas cumplan con los principios de conservación planteados anteriormente.

Los estudios de la genotoxicidad potencial de una sustancia deben incluir ensayos que permitan detectar daño genético, tanto cromosómico como génico, en células somáticas y germinales, para lo cual existen métodos "in vitro" estandarizados en microorganismos, como el ensayo en *Salmonella typhimurium*, propuesto por Ames en 1973, el cual es el más empleado para el tamizaje genotoxicológico de nuevas sustancias propuestas como medicamentos, por su alta predictibilidad en la detección de carcinógenos genotóxicos que inducen mutaciones puntuales. La metodología de incorporación en placas en presencia y ausencia de fracción microsomal hepática S9, es el protocolo estándar que se utiliza comúnmente para realizar la prueba.^{8, 9}

Así tenemos que la mayor dificultad que se presenta en nuestros trabajos con estas cepas es la disminución de la calidad en cuanto a la pérdida total o parcial de los marcadores fenotípicos logrados en las mismas, ya que por lo general estas cepas son susceptibles a los cambios ligeros de temperatura y conservación en general, en tales situaciones pierden en primera instancia su efectividad para detectar compuestos que causan mutaciones génicas, principio fundamental por el cual fueron creadas.

Para lo cual nos trazamos como objetivo fundamental de este trabajo realizar una búsqueda actualizada sobre el tema de cómo conservar cepas de *Salmonella typhimurium* eficientemente para su uso en el ensayo de Ames, siendo evaluadas mediante las pruebas fenotípicas como parámetro de calidad del proceso de conservación, además incluimos resultados preliminares obtenidos por nosotros al evaluar tres cepas con el uso de dos pruebas fenotípicas.

Desarrollo

1. Métodos generales de conservación de microorganismos

Los métodos de conservación para microorganismos se agrupan atendiendo a los factores tiempo y características fisiológicas de la cepa en tres grandes grupos, métodos a largo plazo, métodos a corto plazo y métodos alternativos.

Métodos de conservación a largo plazo.

- Conservación por congelación.

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura.¹⁰ Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero sus desventajas son: requiere aparatos especiales, existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento, resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas.¹¹

- Conservación por liofilización.

La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío. Este proceso consta de tres etapas, la pre congelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada; el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación; y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada.¹²

En las células conservadas por este método no hay crecimiento puesto que la actividad de agua es cero igual que en la congelación pero a diferencia de la primera, los liofilos no tienen agua en el medio debido a la sublimación. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores. Sin embargo, este es un método muy recomendable por su comodidad en almacenamiento y envío de las cepas, pues una vez

conseguidos los liófilos pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18 °C-20 °C o bien de 4-6 °C.¹³

El éxito de la liofilización para la preservación de los microorganismos no sólo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación) sino también de las características físico-químicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo, la concentración de los microorganismos, entre otros.¹⁴⁻¹⁷

Métodos de conservación a corto plazo.

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, fundamentalmente por carecer de los equipos necesarios, porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos o porque las cepas contengan construcciones genéticas. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos.

- Conservación por transferencia periódica o subcultivos.

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio en el que ha crecido, consiste en la transferencia del cultivo a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo. Estos intervalos varían dependiendo de las características del microorganismo en cuestión, algunas especies requieren ser transferidas a nuevos medios después de días o semanas, y otras después de meses o años. Esta frecuencia puede reducirse con el almacenamiento del subcultivo a temperaturas relativamente bajas, en un refrigerador a 4 °C o en un freezer entre -10 °C y -20 °C, bajo aceite mineral o agua, en un período de 15 días a 2 meses.^{18, 19}

- Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril.

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superiores a 5 años, en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar, siendo preparadas en criotubos. La concentración celular no debe ser superior a 10^4 - 10^5 células/ml en el caso

de bacterias. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia, el poder fermentativo y la preservación de transformantes genéticos.²⁰

Métodos alternativos de conservación.

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación. Los cuatro métodos que vamos a citar se basan en la paralización del crecimiento y reducción drástica del metabolismo por eliminación del agua disponible para las células.²¹ Estos métodos de secado son particularmente útiles para conservar microorganismos productores de esporas. Sin embargo, no todos los microorganismos sobreviven a estos métodos de secado, por lo que se hace necesario añadir agentes protectores (leche descremada, glutamato sódico al 10%). Una vez secos es importante mantener el producto sellado (tapón de rosca, ampolla) para evitar el contacto con el aire ya que son higroscópicos.²⁰

²¹ Estos métodos se diferencian en el sustrato inerte que utilizan así tenemos que existe la desecación en papel de filtro, desecación en suelo, arena, silicagel, desecación en bolitas de alginato y desecación en sal gorda para halobacterias.

2. Utilidad del ensayo de ames

Método en el cual se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del marco de lectura (frameshift) o por sustitución de pares de bases del ADN. Para la detección de sustancias promutagénicas, se incluye al ensayo la fracción microsomal de hígado de rata, un sistema de activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema. Diferentes cepas de *S. typhimurium* auxotróficas a histidina son expuestas a una muestra con y sin activación metabólica y plaqueadas en agar medio mínimo con histidina/biotina.²² Dada la composición del medio de cultivo, se forman colonias con las células prototróficas a histidina (his-), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por la muestra problema. Después de 66 horas de incubación a 37 °C, las colonias revertantes son

contadas. El valor igual o mayores dados, de la expresión obtenida de dividir el número de revertantes en las placas de prueba entre el número de revertantes de las placas control, indica la presencia de actividad mutagénica en la muestra problema.²³

Este ensayo propuesto por Ames en 1973,²⁴ el cual es el más empleado para el tamizaje genotoxicológico de nuevas sustancias propuestas como medicamentos, por su alta predictibilidad en la detección de carcinógenos genotóxicos que inducen mutaciones puntuales. La metodología de incorporación en placas en presencia y ausencia de fracción microsomal hepática S9, es el protocolo estándar que se utiliza comúnmente para realizar la prueba.^{25, 26}

3. Evaluaciones incluidas en la prueba fenotípica

Ninguna de las cepas utilizadas en el ensayo de Ames son tipos salvajes, varias mutaciones han sido introducidas para hacerlas más sensibles y poder detectar la posible mutagenicidad de las sustancias a evaluar. Como resultado, estas nuevas cepas no son tan estables como los tipos salvajes. También pueden perder sus características mediante el método elegido para ser conservadas, debe ser un método que sobre todo sea capaz de mantener la variabilidad genética en un rango estrecho, durante un largo período de tiempo. Por todo esto deben chequearse sus características antes de ser usadas. La calidad de las cepas es comprobada mediante las pruebas fenotípicas, las cuales confirman las características de la cepa. Los marcadores de las cepas deben ser comprobados siempre que se reciba un nuevo juego de cepas, cuando preparamos un nuevo lote de congelados permanentes o cultivos liofilizados, cuando el número de revertantes espontáneos por placa está fuera del rango normal o cuando la sensibilidad a mutágenos standard muestra una disminución significativa.²⁷

Uno de los aspectos más importantes es el mantenimiento de la esterilidad, para lo cual deben ser usadas las técnicas asépticas microbiológicas así como procedimientos que eviten la contaminación. Las cepas de *S. typhimurium* usadas más frecuentemente son: TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98, TA 100 y TA 102.²⁸

- Mutación his.

El carácter auxótrofo de las diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* es confirmado al demostrar el requerimiento de éstas al aminoácido histidina para crecer en placas de agar selectivo. Al término del tiempo de incubación en las placas de medio suplementadas con histidina y biotina debe observarse un crecimiento en césped y en las placas de medio no suplementadas con biotina y histidina no se observará crecimiento.²⁹

En la siguiente tabla se encuentran los valores espontáneos de mutación his para las cepas TA 98, 100 y 102.³⁰

Ver Tabla 1.

- Mutación rfa.

Las cepas deben presentar la mutación rfa, carácter que puede ser evaluado por la sensibilidad ante el violeta cristal. Se evalúa como positiva cuando aparece una zona clara de inhibición (aproximadamente 14 mm), cuya aparición indica la presencia de la mutación rfa la cual permite la entrada del cristal violeta a través de la membrana, determinada por la muerte de la bacteria. Esta característica de las cepas, que garantiza la entrada de cualquier sustancia, aún de grandes moléculas que se pongan en contacto con ellas, reduce los falsos negativos.³⁰

- Mutación uvrB.

La presencia de la mutación uvrB puede ser confirmada al demostrar la sensibilidad de las cepas ante la luz U.V. Esta característica de las cepas refleja un daño en el mecanismo de reparación por excisión.³¹ Las cepas con la delección uvrB sólo crecerán en la zona no irradiada de la placa.

- Factor-R.

La presencia de plásmidos que dan resistencia a antibióticos en algunas cepas de *Salmonella Typhimurium* (TA 98, TA 100 a ampicilina) (TA 102 a ampicilina y tetraciclina) hace que sean cepas más sensibles y por tanto obtengamos resultados más confiables.³² Existen dos variantes para comprobar la presencia de plásmidos en la célula y la resistencia a la ampicilina.

Variante A.

En el medio de cultivo escogido suplementado con histidina y biotina debe incorporar la

ampicillina y luego sembrar en forma de estrías las diferentes cepas. Pueden sembrarse varias cepas en una misma placa, se incuban y luego solo las cepas con los plásmidos serán capaces de crecer en este medio.

Variante B.

Se añade cada cepa en cultivo fresco que contenga top agar líquido, luego verter la mezcla sobre medio mínimo suplementado con histidina y biotina (una placa por cepa). Al solidificar la mezcla en la placa debe colocar en el centro de cada placa un disco de ampicillina (alrededor de los 10 mg), incubar a 37 °C, obtendrá como resultado que solo aquellas cepas que crezcan alrededor del disco demostrarán resistencia al antibiótico. Por lo general para la tetraciclina se utiliza la variante B.

- Frecuencia Espontánea de Reversión (F.E.R).

De forma espontánea las diferentes cepas tienen un número de colonias que han revertido su mutación pasando de his⁺ a his⁻. Para cada cepa la F.E.R varía y está influenciada por las condiciones ambientales en las que se desarrolla la cepa y en las mismas condiciones se mantendrá con poca variación. Estos son los rangos standard de la F.E.R, un experimento solo debe ser aceptado cuando el control negativo se encuentre entre esos valores límites.³³

Ver Tabla 2

4. Evaluación mediante las pruebas fenotípicas del método más eficaz en la conservación de cepas his⁻ de *Salmonella typhimurium* como criterio de calidad del proceso:

Diversos autores han destacado lo difícil que resulta el crecimiento y conservación de las cepas de *S. typhimurium* para realizar el ensayo de Ames, como se comentó anteriormente los métodos a corto plazo y métodos alternativos no son apropiados para conservar cepas de este tipo, ya que en los mismos se han obtenido una gran variabilidad genética, e inclusive cepas his⁻ de *Salmonella typhimurium* TA 98, 100 y 102, perdieron totalmente el plásmido incorporado al ser conservadas estas células en una de las mejores variantes, la de subcultivos,²⁶ este tipo de crecimiento mantiene las cepas activas las cuales excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celular. Este es el peor método para conseguir la

estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características, por lo tanto incrementan la posibilidad de mutación, pérdida de las características del microorganismo, riesgo de contaminación y alteraciones en el medio de cultivo durante el estadio en frío.¹⁸

Es conocido que el riesgo de contaminación y de cambios genéticos se incrementa a mayor número de transferencias; así como el peligro de pérdida del cultivo sobre todo cuando se trabaja con microorganismos delicados y la posibilidad de que ocurra deshidratación del medio de cultivo, a estos inconvenientes se suma además que cuando hay muchos microorganismos el trabajo es muy intenso y se requiere un espacio grande para el almacenamiento.^{18, 34}

Por tanto los métodos más eficientes para conservar este tipo de microorganismo lo constituyen los métodos a largo plazo y dentro de estos la conservación por liofilización y por congelación, donde este último a temperaturas extremadamente bajas, es muy simple y se ha logrado estandarizar para la preservación de estas cepas. Con él se obtiene la más reducida pérdida de viabilidad y un grado de estabilidad normal.³⁵

Estos métodos garantizan al máximo la estabilidad genética, al evitar la aparición de generaciones sucesivas y por tanto son los más utilizados en microorganismos que contienen construcciones genéticas las cuales los hacen diferentes a otras cepas y permiten mediante ellas evaluar medicamentos con alto potencial genotóxico y carcinogénico, a partir de la teoría bien abundada sobre las mutaciones.³⁶ Por lo tanto es de vital importancia que el investigador conozca las limitaciones de cada método para que de esta forma pueda obtener resultados reales de gran veracidad científica.

En la congelación debe tener en cuenta la edad de las células utilizando células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, otro factor los constituye la velocidad en la congelación y descongelación y por último la temperatura de almacenamiento las cuales deben ser lo más baja posible, sumergidos en nitrógeno líquido a $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura

de $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero por lo general se utilizan congeladores de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde los cultivos deben ser conservados con un crioprotector no iónico con el cual se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica, como por ejemplo el glicerol al 15-20%, el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc.³⁷⁻³⁹

En determinados estudios se ha destacado la pérdida de la mutación rfa en el orden del 60-70% de las cepas evaluadas a los 4 años en congelación, así como el Factor-R y la F.E.R, a los 4 años y 6 meses en un 50% de aparición en las cepas TA 98, 100, 102, 1535 y 1537,⁴⁰ en cuanto a nuestra experiencia los resultados obtenidos en la prueba fenotípica solo han sido útiles cepas conservadas por congelación por un tiempo máximo de 3 años, ya que a partir de este tiempo al evaluar 4 cepas (TA 98, 100, 102 y 1535), se obtuvieron resultados negativos en cuanto a mutación his y (F.E.R).

Sin embargo al ser conservadas por liofilización las cepas mantienen todas las especificaciones en el rango de un 89-90% durante un periodo mayor a 5 años,⁴¹ además este tipo de conservación permite la producción y distribución masiva de cultivos, la viabilidad, pureza y estabilidad, así como favorece la transportación, ayudando a que los liofilos se mantengan por largos periodos de tiempo, no se requiere de una atención constante después de almacenarse y cientos de éstos pueden guardarse en un pequeño espacio, preferentemente de $4-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y sin bajar de los $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, en la oscuridad.⁴²

En las siguientes tablas (Tabla 3 y 4), podemos observar los resultados obtenidos por nosotros en tres cepas (TA 98, 100 y 102, utilizando 4 replicas en cada una), conservadas durante 3 años en congelación con glicerol al 15% a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y otra variante liofilizada y conservada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, los resultados se obtuvieron en cuanto a mutación his y (F.E.R.), evaluadas cada 1 año, los cuales concuerdan con los datos históricos de conservación para estas cepas.^{43, 44} Se puede observar que en los resultados obtenidos en las tres cepas conservadas existen diferencias significativas a partir del segundo año de conservación cuando comparamos los resultados obtenidos entre los dos métodos. Esto nos permitió afirmar que bajo nuestras condiciones experimentales, para el caso de las cepas TA 98, 100 y 102, el mejor método de conservación es la liofilización y

conservación de los liófilos a 4 °C, durante el periodo evaluado de 3 años, las cuales mantienen el efecto de mutación his y F.E.R.

Ver Tabla 3 y 4

Conclusiones

Teniendo en cuenta la enorme biodiversidad de los microorganismos es evidente que el reto de mantener las colecciones bien conservadas es alto y requerirá de esfuerzos mancomunados de todas las partes involucradas. Hemos de tener presente que, dada la enorme diversidad microbiana, cada microorganismo soportará determinados métodos de conservación mejor que otros, o será necesario tomar precauciones especiales en su conservación ya que no existe un método general de conservación de los microorganismos, aunque no resulta difícil determinar el más aconsejable en cada caso. Este trabajo permitió concluir que para el caso de las cepas *his*⁻ de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames los métodos más eficaces de conservación lo constituyen la liofilización en primer lugar y la congelación a -80 °C como método alternativo para un corto periodo de tiempo, además que las pruebas fenotípicas realizadas a las cepas nos permiten definir cual es el método ideal de conservación, útiles como parámetros de calidad para evaluar el proceso de conservación. En cuanto a nuestra experiencia en el tema pudimos constatar que bajo nuestras condiciones experimentales, para el caso de las cepas TA 98, 100 y 102, el mejor método de conservación es la liofilización con mantenimiento a 4 °C, durante el periodo evaluado de 3 años, las cuales mantienen el efecto de mutación his y F.E.R.

Tabla 1. Valores esperados de mutación his espontánea de las cepas TA 98, 100 y 102.

Cepas de <i>S. typhimurium</i>	Valores esperados de mutación his
TA 98 (his D3052)	20-50
TA 100 (his G46)	75-200
TA 102 (his G428)	100-300

Tabla 2. Valores esperados de reversión espontánea de las cepas utilizadas en el ensayo de ames.

Cepas de <i>S. typhimurium</i>	Valores esperados de reversión espontánea
TA 1535	9-15
TA 1537	6-13
TA 1538	8-15
TA 98	15-23
TA 100	105-140
TA 102	300-350

Tabla 3. Evaluación de 3 cepas mediante la prueba fenotípica de mutación his.

Cepas de <i>S. typhimurium</i>	Evaluación de Mutación his/año	Congelación a -80°C.	Liofilización y conservación a 4°C.
TA 98 (his D3052)	Tiempo 0	40 ± 9,33	40 ± 8,67
	Primer año	38 ± 10,01	40 ± 8,03
	Segundo año	32 ± 6,62*	39 ± 6,93
	Tercer año	20 ± 1,05*	39 ± 6,70
TA 100 (his G46)	Tiempo 0	185 ± 10,98	188 ± 10,52
	Primer año	183 ± 5,35	185 ± 8,82
	Segundo año	120 ± 10,72*	171 ± 8,10
	Tercer año	74 ± 10,56*	171 ± 6,20
TA 102 (his G428)	Tiempo 0	280 ± 5,04	281 ± 4,68
	Primer año	278 ± 2,45	280 ± 3,30
	Segundo año	180 ± 20,78*	275 ± 5,24
	Tercer año	100 ± 30,83*	276 ± 1,02

Determinaciones en 4 placas/cepa, X media; DE desviación estándar.

*p<0.05 (comparación entre métodos de conservación para la misma cepa/año, ANOVA).

Tabla 4. Evaluación de 3 cepas mediante la prueba fenotípica de frecuencia espontánea de reversiones.

Cepas de <i>S. typhimurium</i>	Evaluación (F.E.R)/año	Congelación a -80°C.	Liofilización y conservación a 4°C.
TA 98	Tiempo 0	21 ± 1,44	21 ± 1,78
	Primer año	20 ± 1,02	21 ± 1,53
	Segundo año	18 ± 2,61	21 ± 1,00
	Tercer año	15 ± 2,12*	20 ± 0,70
TA 100	Tiempo 0	138 ± 1,65	138 ± 1,09
	Primer año	135 ± 20,35	136 ± 3,23
	Segundo año	106 ± 3,42*	136 ± 2,10
	Tercer año	105 ± 1,22*	133 ± 3,24
TA 102	Tiempo 0	312 ± 18,01	314 ± 12,46
	Primer año	310 ± 10,27	313 ± 10,22
	Segundo año	301 ± 2,33*	313 ± 5,11
	Tercer año	295 ± 18,12*	318 ± 6,43

Frecuencia espontánea de reversiones (F.E.R), determinaciones en 4 placas/cepa.

X media; DE desviación estándar.

*p<0.05 (comparación entre métodos de conservación para la misma cepa/año, ANOVA).

Figura 1. Observación de las colonias revertantes de *Salmonella typhimurium* en el ensayo de ames.



Referencias Bibliográficas

1. Beech FW, Davenport R. "Isolation, purification and maintenance of yeasts". Methods in Microbiology. Vol 4, Academic Press, London; 2002.p. 153-82.
2. Day JG, McLellan MR. "Cryopreservation and freeze-drying protocols". Humana Press, Totowa, New Jersey; 1999.p. 56-57.
3. Smith D. Ministerio de Salud Pública. Culture Collection Function and Quality Management. Cuba: Instituto de Medicina Tropical; 2000. Curso de Gerencia y Mantenimiento de Colecciones de Cultivos. Serie N° 11.
4. ATCC. Frequently Asked Questions. Bacteriology FAQ. <http://www.atcc.org/.html>. Consultado: 23 de Julio de 2008.
5. Smith D, Onions A. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. IMI Technical Handbooks. Wallingford, 2^{sd} ed. UK: CAB international; 1999.p. 122-24.
6. Hunter JC. "Maintaining cultures for biotechnology and industry". Academic Press, London; 1996.
7. Doyle A. Guidelines for the Establishment and Operation of Collections Cultures of Microorganisms. USD Edition; 1999.
8. Gámez R, Rodeiro I, Fernández I, Acosta P.C. A preliminary evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of D-003: a mixture of very long chain fatty acids, Teratog. Carcinog. Mutag 2001; 22:175.
9. Gutiérrez A, Marrero G, Gámez R, Fernández I, Curveco D, García H. Evaluación del D-004 en el Ensayo de Ames por incorporación directa a placa. Revista CENIC Ciencias Biológicas 2005; 36 Especial.
10. Kirsop BE. "The stability of industrial organisms". Commonwealth Mycological Institute. Kew Edition; 1999.
11. Gherna RL. Preservation Culture. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. Bacteriologic Assays 1998; 34(12):49-50.

- 12.**Sharma B, Smith D. Recovery of Fungi after Storage for over a Quarter of a Century. Technical Communication. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2000; 15(5): 517-19.
- 13.**Malik KA. "Technical information for culture collections curators in developing countries". Braunschweig: UNESCO/WFCC Education Committee Edit; 1996.
- 14.**Onions AH. "Preservation of fungi". Methods in Microbiology Vol 4. London: Academic Press; 1998.
- 15.**Smith D. "The preservation and maintenance of living bacteria and fungi", Preliminary Results. UK CAB international Editions. International Mycological Institute. 2nd ed; 1994.p. 35-37.
- 16.**Ryan MJ, Smith D, Jeffries P. A Decision-based Key to Determine the Most Appropriate Protocol for the Preservation of Fungi. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2000; 16(7):183-86.
- 17.**Snell, JJ. General Introduction to Maintenance Methods, Maintenance of Microorganisms and Cells 1st edition. London:. B.E. Kirsop and A. Doyle (eds); 1997.
- 18.**Snell J.J. General Introduction to Maintenance Methods. Maintenance of Microorganisms and Cells. 2nd edition. London:. B.E. Kirsop and A. Doyle (eds); 2001.
- 19.**Merck E. Principals methods of micro organisms conservation. Darmstat. Merck KGAA Edition. Microbiology Manual. 2nd edition; 2000.p.407-10.
- 20.**Hill LR. Living Resources for Biotechnology. Cambridge: Cambridge Edition; 2000.
- 21.**Weng Z, Junco RA, Díaz OE, Álvarez I, Beltrán JR. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. Rev Cubana Hig Epidemiol 2005; 43 (3):7-10.
- 22.**García-Peñalver L, Sureiro RA, Garrido MJ. Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. En: Xa Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental; 2000.p.109.

- 23.**Hazen, M. Las células vegetales como sistema de ensayo para la evaluación de compuestos fotoactivos. Evaluación mutagénica y genotóxica. Ed: Sociedad Española mutagénesis Ambiental; 2000.p.81.
- 24.**Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens and mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc.nat.Acad.Sci 1973; 70(2): 281-5.
- 25.**Rodeiro I, Gámez R, Acosta P, Fernández I, Más R, Alemán C. Estudio de la genotoxicidad del D-002, un producto con actividad antiulcerosa. Rev. Española de Toxicología, 1998; 15 (3):117-21.
- 26.**Maron DM, Ames BN. Methods of conservation of strains of Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 1983; 113 (3):173-4.
- 27.**Vizoso A, García A, Ramos A, Piloto R, Pavón V, Penichet M. Evaluación mutagénica de un extracto fluido con un mensturo etanólico al 70 % de *Teloxys ambrosioides*. weber (apasote). Rev Cubana Plant Med 2000; 5(3):102-5.
- 28.**Zeiger E, Andersen B, Howarth S, Timoty L, Mortelmar F. *Salmonella* mutagenicity test: V. Results from the testing of 311 chemical. Env Molec Mutat 1992; 21(2):141.
- 29.**Ikken Y, Morales P, Casas C, Martínez A, Haza A, Cambero M.I. Mutagenicity and cytotoxicity of fruits and vegetables evaluated by the Ames test and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Food science and technology international 2000; 3(1): 431-7. ISSN 1082-0132.
- 30.**Sandoval, A. M. Estandarización de dos técnicas analíticas para la determinación de mutágenos empleando *Salmonella typhimurium*. Tesis de Maestría. Facultad de estudios superiores de Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México; 1998.p.83.
- 31.**Piloto J, Ramos A, Vizoso A, García A. Evaluación del potencial genotóxico de un extracto fluido de incienso (*artemisia Absinthium* L.). Rev Cubana Plant Med 2000; 5(2):64-7.

- 32.**Sheehy R, Perry A, Allison D, Curtiss R. Molecular Nature of R-Factor Deoxyribonucleic Acid Isolated from *Salmonella typhimurium* Minicells. *J Bacteriol* 1973; 114(3): 1328–35.
- 33.**Ames B.N, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenesis test. *Mutation Research* 1975; 31: 347-364.
- 34.**García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad. Microbiología SEM* 2002; 30(6):6-12.
- 35.**Porter JR. The World View of Culture Collections, The Role of Culture Collections in the Era of Molecular Biology. Washington: American Society for Microbiology, R.R.Colwell ed; 2000.p. 36-37.
- 36.**Bacteriology. Mutaciones en Procariota.
[http://www.ugr.es/~eianez/Microbiología/index .htm](http://www.ugr.es/~eianez/Microbiología/index.htm). Consultado: 6 de Agosto de 2008.
- 37.**Malik KA. Freeze drying of microorganisms using a simple apparatus. Education Committee. U/W, 29-32. K. A. Malik (ed). *Technical Information for Culture Collections Curators in Developing Countries*; 1996.p. 256-260.
- 38.**Nakase T. Quality Control Systems of Microbial Cultures in Japan Collection of Microorganisms (JCM), Ch.5. Veldhoven, The Netherlands: Proceedings of the Eighth International Congress for Culture Collections; 1996.
- 39.**Packer P. The Camp Bacterial Cultura Collection (CBCC): The Establishment of a New Cultura Collection According to WFCC. *Culture Collections*. Veldhoven, The Netherlands; 1999.
- 40.**Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella* microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 2000; 455: 29–60.
- 41.**Lugo De la Fuente, G. Enterobacterias. *Bacteriología Médica*. México D.F, Ediciones Cuellar. Segunda edición; 2000.p.71-153.
- 42.**Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. *Rev Argen Microbiol* 2000; 30(8): 42-51.

43. Mahon G, Green M, Middleton B, Mitchell I, Robinson W, Tweats D. Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part. II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ediciones. Kirkland, Cambridge University Press; 1989.p.28-65.
44. Dockets B, Lane F. Estudios de Toxicidad Genética para Evaluar la Seguridad de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos Humanos. Food and Drug Administration of Center for Veterinary Medicine, U.S.A; 2006.p.7-8.

Recibido: 12/08/09

Aceptado: 12/08/09