

**EFFECTO DE LA PRESERVACIÓN EN DISCOS DE GELATINA Y  
LIOFILIZACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD Y METABOLISMO EN CEPAS  
DE *Streptococcus mutans*.**

**ADRIANA DEL PILAR MORA PARRA**

**TRABAJO DE GRADO**  
Presentado como requisito parcial para optar el título de

**BACTERIOLOGA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BACTERIOLOGÍA**  
Bogotá D.C  
2001

**EFFECTO DE LA PRESERVACIÓN EN DISCOS DE GELATINA Y  
LIOFILIZACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD Y METABOLISMO EN CEPAS  
DE *Streptococcus mutans*.**

**ADRIANA DEL PILAR MORA PARRA**

---

**Freddy Omar Gamboa J.**  
**Doctor en ciencias. P.U.J**  
Director

---

**Margarita Chaves C**  
**Bacterióloga .P.U.J**  
Codirector

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BACTERIOLOGÍA**  
Bogotá D.C  
2001

**EFFECTO DE LA PRESERVACIÓN EN DISCOS DE GELATINA Y  
LIOFILIZACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD Y METABOLISMO EN CEPAS  
DE *Streptococcus mutans*.**

**ADRIANA DEL PILAR MORA PARRA**

---

**Dra. Aura Rosa Manascero**  
Directora de carrera Bacteriología

---

**Dr. Carlos Corredor**  
Decano Académico

**Bogotá, Agosto 2001**

**EFFECTO DE LA PRESERVACIÓN EN DISCOS DE GELATINA Y  
LIOFILIZACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD Y METABOLISMO EN CEPAS  
DE *Streptococcus mutans*.**

**ADRIANA DEL PILAR MORA PARRA**

---

**Dra. Nelly Susana Rueda**  
Jurado

---

**Dr. Didier Fernández**  
Jurado

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA  
Bogotá D.C  
2001**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

LOS CRITERIOS PRESENTADOS, LAS OPINIONES EXPRESADAS Y LAS  
CONCLUSIONES ANOTADAS SON RESPONSABILIDAD DEL AUTOR Y NO  
COMPROMETEN A LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
ARTICULO 23 DE LA RESOLUCIÓN DEL 13 DE JULIO DE 1996.

## **AGRADECIMIENTOS**

Antes que nada quiero agradecerle a Dios porque sin Él nada sería posible, porque sin su ayuda no hubiera culminado este gran paso de mi vida.

Agradezco a mis padres Abraham y Floresmira por su apoyo absoluto y por haberme inculcado el valor de la responsabilidad.

A mis hermanos Carlos Andrés y Felipe por acompañarme en cada paso de mi vida y compartir todas mis alegrías.

A John Alexander Rodríguez , quien ha brindado un amor incondicional y sincero en esta etapa tan importante para mi.

Al Dr. Freddy Gamboa y a la Dr. Margarita Chaves por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto .

A la Dr., Lorenza Jaramillo por su oportuna y desinteresada colaboración.

Al Centro de Investigaciones Odontológicas por darme la oportunidad y el apoyo financiero para realizar este trabajo y a todas las personas que colaboraron para la realización de este proyecto.

## **ORACIÓN DEL ESTUDIANTE**

Señor Dios, fuente de la sabiduría,

Principio supremo de todas las

cosas: derrama tu luz en mi

Inteligencia y aleja de ella las

Tinieblas del pecado y de la

Ignorancia.

Concédeme penetración para

entender,

Memoria para retener,

Método para aprender,

Lucidez para interpretar y expresarme.

Ayuda el comienzo de mi trabajo,

Dirige su progreso,

Corona su fin,

Por Cristo, nuestro señor. Amén.

*Santo Tomás de Aquino*

## TABLA DE CONTENIDO

	Pg.
<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	8
<b>2. MARCO TEORICO</b>	10
2.1 Flora microbiana oral	10
2.2 Caries dental y <i>Streptococcus mutans</i>	13
2.2.1 Relación de los estreptococos con la caries dental	14
2.3 Propiedades del <i>Streptococcus mutans</i>	16
2.3.1 Taxonomía	16
2.3.2 Estructura	16
2.3.2.1 Citoplasma	16
2.3.2.2 Nucleoide	17
2.3.2.3 Membrana plasmática	18
2.3.2.4 Pared	18
2.3.2.5 Glicocalix	19
2.4 Metabolismo	20
2.5 Preservación	21
2.5.1 Subcultivo	22

2.5.2 Inmersión en aceite mineral	23
2.5.3 Discos de gelatina	24
2.5.3.1 Detalles del método	24
2.5.4 Congelación común	25
2.5.5 Ultracongelamiento	26
2.5.6 Liofilización	26
2.5.6.1 El proceso de la liofilización	27
2.5.6.2 Congelación	29
2.5.6.3 Secado primario o sublimación	30
2.5.6.4 secado secundario o post-secado	31
<b>3.OBJETIVOS</b>	32
<b>4.METODOLOGÍA</b>	33
4.1 Cepas	33
4.2 Preservación	34
4.2.1 Discos de gelatina	34
4.2.1.1 Evaluación de la preservación en gelatina	34
4.2.2 Liofilización	35
4.2.2.1 Evaluación de la preservación en liofilización	36
<b>5. RESULTADOS</b>	37
5.1 Viabilidad	38
5.1.1 primer mes de evaluación	38
5.1.1.1 Liofilización en leche descremada al 20%	38
5.1.1.2 Discos de gelatina	39

5.1.2 Segundo mes de evaluación	41
5.1.2.1. Liofilización en leche descremada al 20%	42
5.1.2.2 Discos de gelatina	44
5.1.3. Tercer mes de evaluación	44
5.1.3.1 Liofilización en leche descremada al 20%	45
5.1.3.2 Discos de gelatina	47
5.1.4 Cuarto mes de evaluación	47
5.1.4.1 Liofilización en leche descremada al 20%	48
5.1.4.2 Discos de gelatina	49
5.2 Comportamiento bioquímico	50
5.3 Analisis estadístico	51
<b>6. DISCUSIÓN DE RESULTADO</b>	<b>52</b>
<b>7.CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>8.RECOMENDACIONES</b>	<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE TABLAS

- **Tabla 1** : Expectativa de vida de algunas bacterias que se aíslan en cavidad oral preservadas por varios métodos.
- **Tabla 2** : Identificación bioquímica para *Streptococcus mutans*
- **Tabla 3** : UFC en leche descremada al 20% en 6 y 24 horas de incubación.
- **Tabla 4** : UFC en discos de Gelatina en 6 y 24 horas de incubación.
- **Tabla 5** : Resumen de los resultados finales.
- **Tabla 6** : Análisis estadístico.

## LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1:** Liofilizador marca LABCONCO, Freezone 4.5
- **Figura 2:** Cepa de *Streptococcus mutans* en Agar Mitis salivarius.
- **Figura 3:** Vial para la preservación de *Streptococcus mutans* Discos de Gelatina.
- **Figura 4:** Tubo con micropocillos de Elisa para los Discos de Gelatina.
- **Figura 5:** Micropocillos de Elisa con los Discos de Gelatina.
- **Figura 6:** Viales con liofilizado de leche descremada al 20%.

## LISTA DE GRAFICOS

- **Grafica 1:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante un mes en liofilizado de leche descremada al 20% y con un tiempo de incubación previa de 6 horas.
- **Grafica 2:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante un mes en liofilizado de leche descremada al 20% y con un tiempo de incubación previa de 24 horas.
- **Grafica 3** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante un mes en discos de gelatina y con un tiempo de incubación previa de 6 horas.
- **Grafica 4** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante un mes en discos de gelatina y con un tiempo de incubación previa de 24 horas.
- **Grafica 5:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante dos meses en liofilizado de leche descremada al 20% y con un tiempo de incubación previa de 6 horas.
- **Grafica 6:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante dos meses en liofilizado de leche descremada al 20% y con un tiempo de incubación previa de 24 horas.
- **Grafica 7:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante dos meses en discos de gelatina y con un tiempo de incubación previa de 6 horas.

- **Grafica 8:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante dos meses en discos de gelatina y con un tiempo de incubación previa de 24 horas.
- **Grafica 9:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante tres meses en liofilizado de leche descremada al 20% y con un tiempo de incubación previa de 6 horas.
- **Grafica 10:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante tres meses en liofilizado de leche descremada al 20% y con un tiempo de incubación previa de 24 horas.
- **Grafica 11:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante tres meses en discos de gelatina y con un tiempo de incubación previa de 6 horas.
- **Grafica 12:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante tres meses en discos de gelatina y con un tiempo de incubación previa de 24 horas.
- **Grafica 13:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante cuatro meses en liofilizado de leche descremada al 20% y con un tiempo de incubación previa de 6 horas.
- **Grafica 14:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante cuatro meses en liofilizado de leche descremada al 20% y con un tiempo de incubación previa de 24 horas.
- **Grafica 15:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante cuatro meses en discos de gelatina y con un tiempo de incubación previa de 6 horas .
- **Grafica 16:** Recuperación en UFC de 33 cepas de *Streptococcus mutans* preservadas durante cuatro meses en discos de gelatina y con un tiempo de incubación previa de 24 horas .

## RESUMEN

La preservación de microorganismos también es una urgente necesidad en los procesos de enseñanza, en laboratorios industriales, en taxonomía y en los laboratorios de investigación para múltiples propósitos en estudios metabólicos, genéticos, epidemiológicos, inmunológicos, fisiológicos y patológicos.

Este estudio evaluó el efecto de los métodos de preservación en discos de gelatina y liofilización en leche descremada al 20% y el comportamiento bioquímico sobre 33 cepas de *Streptococcus mutans* previamente aisladas de niños con y sin caries pertenecientes a un preescolar en Turmequé( Boyacá) y almacenadas en el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana ).

La preservación se realizó a partir de un homogenizado de *Streptococcus mutans* ( Mc Farland #2) el cual fue sometido a liofilización en leche descremada al 20% y discos de gelatina como métodos a largo y corto tiempo.

La comparación de los dos métodos se realizó por el conteo de Unidades Formadoras de Colonias en Agar Mitis salivarius y Agar Sangre previamente reconstituidas en caldo nutritivo con un periodo de evaluación de cuatro meses.

Los resultados y el análisis estadístico (Chi cuadrado.  $p < 0.001$ ) indican que la preservación por liofilización en leche descremada al 20% es mas significativo que el

obtenido en los discos de gelatina, constituyendo así la liofilización como un método óptimo y fácil de realizar para la preservación de *Streptococcus mutans*.

La dificultad para la realización de discos de gelatina forma un método que implica alto costo y gran riesgo de contaminación, gracias a la manipulación constante de esta.

## 1.INTRODUCCIÓN

Las infecciones de la cavidad oral, en especial la caries dental y la enfermedad periodontal, son las infecciones bacterianas más frecuentes en la especie humana. La caries dental es una enfermedad que involucra en su patogenia factores primarios, como son el hospedador, el medio ambiente, el sustrato y el agente causal.

Los estreptococos del grupo mutans y entre estos el *Streptococcus mutans* (S.mutans) serotipo C, son importantes agentes etiológicos asociados a las etapas iniciales en caries de corona y raíz (7).

La principal función de cualquier cepario es actuar de depósito de todos los microorganismos aislados e identificados en investigaciones realizadas en el pasado y en el presente. La preservación apropiada de los microorganismos que hacen parte del cepario es extremadamente importante y debe tener la misma atención que la estandarización de equipos y la selección de reactivos químicos. Igualmente, la preservación de microorganismos debe garantizar la viabilidad del organismo en estado inactivo, puro, sin variaciones ni mutaciones, es decir en una condición lo más cercanamente posible a la original.

Entre otras se dan cuatro razones para contar con microorganismos debidamente preservados: 1. en los procesos de enseñanza, para facilitar el aprendizaje, se requieren microorganismos de referencia que exhiban características típicas; 2. en los

laboratorios industriales, se necesitan microorganismos para el mantenimiento de la producción de ciertos productos; 3.en taxonomía para realizar estudios comparativos y 4. en los laboratorios de investigación para múltiples propósitos en estudios metabólicos, genéticos, epidemiológicos, inmunológicos, fisiológicos y patológicos (5).

En la preservación de microorganismos se han empleado muchos métodos, pero no todos los organismos responden de una manera similar al método empleado.

Muy a menudo la disponibilidad de equipo, el espacio para almacenar y la experiencia propia determinan el método a emplear.

Al no existir experiencia en la preservación de *Streptococcus mutans*, se quiere con este estudio mirar la utilidad del método de preservación a corto plazo(discos de gelatina), y un método de preservación a largo plazo(liofilización).

## **2.MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Flora microbiana oral**

La cavidad bucal es un ecosistema dinámico, abierto y dispuesto a numerosos factores, presenta una amplia y compleja variedad de flora microbiológica, la cual puede ser transitoria o residente en respuesta a las modificaciones que afectan características intrínsecas del ambiente oral y que con frecuencia causan diversas patologías.(2).

El ser humano es desdentado en el nacimiento y tiene una flora característica en ese estado. Cuando los dientes primarios empiezan a erupcionar, hay un cambio significativo en ese medio, que se refleja por los cambios en la flora oral. Cuando se completa la dentición primaria, las condiciones son relativamente estables hasta que comienzan a erupcionar los dientes permanentes. Desde el periodo de la dentición mixta las condiciones varían al tiempo al que se pierden algunos dientes y erupcionan otros nuevos, produciendo condiciones variadas que pueden afectar la flora oral. Una vez que esta presente la dentición permanente, las condiciones se vuelven mas estables. La cavidad oral normalmente soporta una de las poblaciones mas variadas y concentradas de cualquier parte del organismo, con focos principales

en el dorso de la lengua, alrededor del surco gingival y en la superficie de los dientes.  
(1).

El recuento microscópico total de la saliva, que representa el enflujado de la lengua, se considera en un promedio de unos 750 millones .en donde la concentración microbiana alrededor del surco gingival y en la placa se aproxima a 2000.000 millones de células por gramo de muestra. Esta cantidad de células es equivalente a la densidad del sedimento empaquetado por fuerzas centrífugas en un caldo de cultivo o en una colonia bacteriana.(1).

*In útero*, el feto normalmente está libre de gérmenes. Durante el nacimiento el niño es probablemente inoculado con la flora del tracto genital de la madre, entre las que se encuentran, lactobacilos, corinebacterias, micrococos, coliformes, estreptococos alfa, beta , anaerobios, levaduras, protozoarios y probablemente virus. No obstante la cavidad oral generalmente es estéril en el momento del nacimiento. Aproximadamente 8 horas después del nacimiento hay un aumento rápido de microorganismos en cavidad oral . No obstante la composición bacteriana varía considerablemente en los primeros días de la vida. Por ejemplo, los gemelos idénticos pueden albergar distintas cepas de la misma especie, y se mantiene cierta selectividad en la edad adulta. . (1).

Por lo menos para el fin del tercer mes de nacido todas las bocas alojan una microflora. Aún al cabo del año, no obstante se encuentran generalmente en todas las bocas sólo estreptococos, estafilococos, veillonellas y neisserias. Los actinomicetes, nocardias, lactobacilos y fusobacterias pueden ser cultivados de aproximadamente la mitad de las bocas. Los bacteroides, las leptotrichias, las corinebacterias y los

coliformes se aíslan de menos de la mitad de las bocas .Los estreptococos siguen predominando numéricamente pero después del tercer mes corresponden al 70% de la cuenta viable. Los rangos de los distintos recuentos son tan altos que es difícil determinar si esta variación significa simplemente aumentos de otras bacterias o reemplazos de estreptococos por ellas. El primer periodo es llamado especies facultativas, a las que se agregan gradualmente los distintos anaerobios obligados, pero numéricamente los tipos facultativos generalmente dominan en todas las edades.(1).

Los efectos de la erupción de los dientes en la microflora oral no están bien definidos. La presencia de dientes provee zonas para el crecimiento de microorganismos adaptados en las condiciones ambientales en torno de estas estructuras; por ejemplo el *Streptococcus mutans* parece colonizar preferencialmente la placa.

Durante la niñez, las poblaciones bacterianas aumentan. Las proporciones de microorganismos cultivables predominantes de la zona del surco gingival en los niños preescolares se asemeja a la de los adultos, exceptuando al *Bacteroides melaninogenicus* y las espiroquetas no están presentes en los niños. En la adolescencia , el *B.melaninogenicus* está presente en prácticamente todos los individuos. Las espiroquetas también aumentan su incidencia con la edad. El desarrollo de la caries dental provee un grupo totalmente nuevo de condiciones ambientales para los microorganismos. Aquellos que tienen poca capacidad de adhesión , reciben protección de manera que pueden conservarse. La lesión ofrece nuevos sustratos, un pH más ácido y probablemente una menor exposición a los factores antimicrobianos salivales. La cavidad oral del adulto es sumamente compleja

. algunas especies tienen predilección por sitios particulares en la cavidad oral, probablemente debido a que se encuentran en ese sitio ciertos requerimientos nutricionales o físicos . al tiempo que el individuo envejece, se producen algunos cambios en la microflora, principalmente asociados con la pérdida de dientes. Se reproducen las espiroquetas, los lactobacilos y algunas cepas de estreptococos. La presencia de varias formas de enfermedad oral altera aún mas la flora, dependiendo de los cambios específicos del proceso nosológico que se produzca.

No solo la extracción de todos los dientes y la colocación de prótesis completa influye sobre la cantidad total de la flora microbiana oral, sino también lo hace sobre la incidencia de especies particulares. Varios estudios han demostrado que el *Streptococcus mutans*, el *Streptococcus sanguis*, las levaduras, los lactobacilos y las espiroquetas se reducen o virtualmente se eliminan durante el periodo desdentado. Durante las dos primeras semanas después de la colocación de una prótesis, los estreptococos se mantienen a un nivel alto, mientras que los lactobacilos y las levaduras retornan virtualmente pero se mantienen a un nivel bajo.

Al cabo de tres a cinco semanas los lactobacilos y las levaduras aumentan y los estreptococos disminuyen a los niveles previos a las extracciones. Durante todo el periodo los estafilococos no fluctúan significativamente. (1).

## 2.2 Caries dental y *Streptococcus mutans*

El término caries (del latín descomponerse, o pudrirse, echarse a perder) se refiere a la destrucción progresiva localizada de los dientes, predominantemente sus coronas. Este proceso se inicia por la desmineralización de la superficie externa del esmalte ,

por ácidos orgánicos producidos localmente por colonias o placas de bacteria que fermentan los hidratos de carbono de la dieta. Con la pérdida progresiva del mineral dentario y la destrucción secundaria de sus proteínas por la persistente acción bacteriana, se forman caries que destruyen la mayor parte del diente, llevando a menudo a una grave infección de la pulpa y los tejidos que la rodean. Pocas patologías ejemplifican tan bien como la caries la gama de interacciones multifactoriales, entre el huésped, el parásito y el ambiente, que determinan el curso de una enfermedad infecciosa. Nuestra comprensión de la patogenia de la caries ha avanzado sorprendentemente en los últimos años. Se dispone de medidas técnicamente efectivas que podrían reducir en gran forma la incidencia de esta enfermedad y minimizar su recurrencia en los sitios restaurados: la fluorización, el consumo reducido de azúcar, la odontología profiláctica o el sellado de las zonas de fisuras oclusales altamente susceptibles. No obstante la caries sigue siendo un problema principal de la salud pública en regiones cada vez más extensas, debido a la indiferencia pública general o a la oposición activa a las medidas preventivas(1).

### *2.2.1 Relación de los estreptococos con la caries dental:*

Desde la época en que Miller encontró estreptococos en la cavidad oral, éstos han recibido bastante atención como agente causal de la caries dental. Inicialmente los estreptococos orales estaban implicados en la caries dental, debido a que abundaban en la cavidad oral, porque estaban presentes en la caries dentarias profundas y en base a su constancia como agente causal de pulpitis que acompañaba a las caries dentinarias profundas, sin exposición pulpar.

Se ha acumulado evidencia que los estreptococos, en realidad, constituyen aproximadamente la mitad de la cuenta viable de la placa bacteriana y del surco gingival. Los estreptococos son muy abundantes en la cavidad oral tanto en niños como en adultos, aislándose una mayor cantidad en la placa que está sobre el esmalte precario, transicional y carioso que cualquier otra especie bacteriana.

Otra característica de los estreptococos orales que se relacionan con la cariogenicidad es que su velocidad de crecimiento y producción de ácido excede la de cualquier otro microorganismo oral. La falta de cambio en cantidad con relación a la susceptibilidad, actividad o resistencia a la caries es otro elemento en contra de los estreptococos como causa exclusiva de la caries dental.

El *Streptococcus mutans* fluctúa en la placa, en las fisuras del esmalte, los espacios interproximales y en la lengua. Algunos informes sugieren que la presencia de *S. mutans* en un sitio puede tener cierto valor para preceder la incidencia de caries dental. En los años recientes se ha concentrado la atención sobre la relación de *S. mutans* y la caries. Este microorganismo es una especie nativa en humanos con varios serotipos conocidos con una distribución que abarca todo el mundo. Su hábitat normal es la superficie del diente. La patogenia de la caries de los estreptococos tales como el *S. mutans*, puede relacionarse con varios factores, como mecanismos de adherencia y colonización, metabolismo de carbohidratos, y otros los cuales no han sido definidos.(1.)

## 2.3 Propiedades del *Streptococcus mutans*:

### 2.3.1 Taxonomía

Según la hemólisis producida por el grupo de los *Streptococcus*, este se ha subdividido en tres grupos : Los *Streptococcus* que presentan hemólisis  $\alpha$  ó  $\beta$ , los *Enterococcus* que pueden presentar hemólisis  $\alpha$ ,  $\beta$ , ó  $\gamma$  y los *Lactococcus* que presentan solo hemólisis  $\gamma$ . El grupo de los *Streptococcus* que tiene hemólisis  $\alpha$  y  $\beta$  se han subclasificado en dos grupos, los *viridans* que hacen la hemólisis  $\alpha$ , y los *piógenes* que hacen hemólisis  $\beta$ .(3)

Los *Streptococcus* del grupo *viridans* tienen como hábitat la cavidad oral humana, entre ellos están: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* y *el Streptococcus milleri*.

### 2.3.2 Estructura

Los microorganismos que pertenecen a este grupo, no difieren del modelo general de los demás *Streptococcus*, excepto en la ausencia de cápsula polisacárido C y las fimbrias que cuando existen no son muy sobresalientes.

#### 2.3.2.1 Citoplasma

El *Streptococcus mutans* posee un citoplasma, el cual es un sistema coloidal, formado en un 85% por agua, principios inmediatos, minerales y enzimas. En la periferia están las inclusiones citoplasmáticas cuya función es la regulación o almacenaje de sustancias, que se catalogan como vacuolas, las cuales son acúmulos de líquido o gases rodeadas de membrana y granulaciones que son inclusiones

sólidas. También en el citoplasma están presentes los mesosomas que son invaginaciones de la membrana citoplasmática, las cuales tienen diferentes funciones: si son septales ayudan en la formación del tabique de separación del cromosoma y si son laterales participan en funciones secretoras. También se pueden observar los ribosomas que son estructuras redondas formadas de ARN constituidas por dos subunidades, la 30s y la 50s, estos se hallan en gran cantidad agrupados y unidos por un filamento de ARNm, dándole al citosol un aspecto granuloso; como es bien sabido, estos son los encargados de la síntesis proteica. (3)

#### *2.3.2.2 Nucleoide*

En estos organismos existe una región central de aspecto fibrilar, que corresponde al nucleoide. En él se encuentra un cromosoma único que contiene la información genética responsable de las funciones bacterianas como la síntesis de proteínas y la división celular. Este contiene ADN de doble cadena, unidas por puentes de hidrógeno entre las bases complementarias.

Está constituido por bases púricas (adenina y guanina) y bases pirimidínicas (citosina y timina), desoxirribosa y ácido fosfórico y se encuentra libre en el citoplasma. Tiene también proteínas asociadas al nucleoide que se unen a la doble hebra de ADN, estas son proteínas similares a histonas, que en otras funciones tiene la de formar un complejo con el ácido lipoteicoico, y este complejo ha mostrado tener la capacidad de unirse a la superficie de las células epiteliales humanas in Vitro. Se ha observado también que el nucleoide está asociado a la membrana plasmática.

#### 2.3.2.3. *Membrana plasmática*

Esta es una bicapa de fosfolípidos a la que se encuentran asociadas proteínas específicas. Esta membrana no contiene esteroides, y el ácido graso predominante es el palmítico que ha sido encontrado en el 80% de las cepas de *Streptococcus mutans*; otros ácidos grasos encontrados han sido el ácido eicosenoico, el ácido octadecanoico, el ácido esteárico y en una menor proporción se han encontrado el ácido laurítico, mirístico, palmitoleico, y eicosanoico.

La función principal de esta estructura como barrera osmótica es ser selectivamente permeable por mecanismos de transporte activo. También interviene en la producción de energía por fosforilación oxidativa, síntesis de elementos estructurales, secreción de proteínas al exterior, división celular, también posee proteínas receptoras para la quimiotaxis, y regula la acción de detergentes y antimicrobianos ( 1).

#### 2.3.2.4 *Pared*

Es una cubierta rígida que envuelve la bacteria por fuera de la membrana plasmática y está encargada de proteger, dar rigidez y forma a la bacteria, protegiéndola de la presión osmótica. La pared está compuesta por una capa externa de glicanos o levanos que crecen en presencia de sacarosa y una capa más densa de peptidoglicano constituido por ácido glutámico, alanina, lisina, glucosamida y ácido murámico entrecruzado que se conoce como mureína y atraviesa toda la membrana celular. Unidos a esta superficie se hallan los polisacáridos L-ramnosa y otros azúcares que especifican el serotipo.

Los ácidos lipoteicoicos van de la membrana citoplasmática a la pared celular, estos se pueden unir a proteínas de la pared y así intervienen en procesos de adhesión. Las proteínas de la pared se insertan en la membrana por su porción C-terminal, y pueden atravesar la pared, y las fimbrias. Una de esas proteínas conocida como PAC, Ag I/II, proteínas B, P1 o SpaP, es altamente antigénica, tiene un peso molecular de 190 KDa ha sido implicada en la unión inicial del microorganismo a la superficie dental a través de las proteínas de la película adquirida. Por esta razón ha sido ampliamente utilizada como antígeno vacunal. También le da la capacidad al microorganismo para unirse al colágeno de los túbulos dentinales, proceso que puede ser importante en el desarrollo de la caries en la superficie radicular.

#### *2.3.2.5 Glicocalix*

El glicocalix es la cubierta bacteriana más externa. Tiene aspecto de gel y es un elemento facultativo compuesto por polisacáridos extracelulares. No es uniforme en densidad y grosor y es eliminada fácilmente por estar poco unida a la superficie bacteriana. Posee un gran contenido acuoso y contiene glucanos y fructanos. Es sintetizado por enzimas de la membrana citoplasmática. Es muy importante para la adherencia bacteriana a la superficie dental y también es un mecanismo defensivo por que impide la fagocitosis y el contacto con anticuerpos, enzimas, biodegradantes y antibióticos.

## 2.4 Metabolismo:

El *Streptococcus mutans* es un anaerobio facultativo, capaz de producir polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa por medio de dos enzimas: la Glucosil Transferasa (GTF) y la Fructosil Transferasa (FTF). También es un microorganismo que presenta hemólisis en agar sangre y es sensible a la penicilina, eritromicina y clindamicina.

El *Streptococcus mutans* es un microorganismo acidófilo, es decir que crece a un pH mas bajo , y su crecimiento se favorece cuándo su hábitat se convierte en ácido por el consumo de azúcares. Este microorganismo es habitualmente una bacteria homoláctica, por la mayor producción de ácido láctico y formato acetato y etanol en una menor cantidad.

Estas bacterias utilizan la vía glicolítica de Embden Meyerhof para la degradación de glucosa y cuando hay presencia de otros azúcares son convertidos a intermediarios de la vía glucolítica por medio de enzimas inducibles .

A partir de la sacarosa el *Streptococcus mutans* produce polisacáridos extracelulares insolubles, gracias a la acción de dos enzimas la glucosiltransferasa (GTF) la cual sintetiza glucanos a partir da la glucosa, lo cual es un importante factor de virulencia porque promueve la unión inicial a la superficie del diente y la fructosiltransferasa (FTF) que sintetiza fructano a partir de la fructosa.

## 2.5 Preservación:

La principal función de cualquier cepario es la de servir de depósito de todos los microorganismos aislados e identificados en investigaciones realizadas en el pasado y en el presente.

La preservación apropiada de los microorganismos que hacen parte del cepario es extremadamente importante y debe tener la misma atención que la estandarización de equipos y la selección de reactivos químicos. Igualmente, la preservación de microorganismos debe garantizar la viabilidad del organismo en estado inactivo, puro, sin variaciones ni mutaciones, es decir en una condición lo más cerca posible a la original.

Entre otras se dan cuatro razones para contar con microorganismos debidamente preservados.

1. En los procesos de enseñanza, para facilitar el aprendizaje, se requieren microorganismos de referencia que exhiban características típicas
2. En los laboratorios industriales se necesita mantener las características de los microorganismos para tareas de producción.
3. Los taxonomistas tienen que mantener un amplio número de características microbiológicas para estudios comparativos.
4. Los laboratorios de investigación requieren cultivos bacterianos puros para múltiples propósitos.(6)

Frecuentemente los cultivos bacterianos son irremplazables, otros pueden ser resembrados o reemplazados por uno de la bacterioteca. En estos casos el tiempo, el

dinero o la información es una pérdida para los laboratorios, pero esto se puede evitar con un sistema de preservación bacteriana. (12).

Existen métodos de preservación a largo y a corto tiempo; como métodos de preservación a corto tiempo están:

### ***2.5.1.El subcultivo***

Consiste en la transferencia periódica del cultivo a medio fresco a intervalos que varían según el microorganismo, el medio de cultivo utilizado y las condiciones ambientales. Dado que la preservación del cultivo por este método requiere de la multiplicación celular y de un metabolismo activo el mismo conlleva a un alto riesgo de alteraciones en las características de interés, sobre todo cuanto necesitan repiques frecuentes.

Tiene la ventaja de no requerir equipamiento especializado y en cepas relativamente estables se ha utilizado satisfactoriamente. Cultivos en punción bien desarrollados de *Salmonella spp*, sellados con parafina y almacenados a 4°C han sobrevivido por 35 años sin alteraciones genotípicas y con altos niveles de viabilidad, mientras que cepas de *Neisseria spp* sobreviven apenas 1 año en condiciones óptimas.

La frecuencia de las transferencias puede ser reducida disminuyendo el metabolismo celular almacenado a bajas temperaturas (4-8°C), utilizando medios de cultivo mínimos o cubriendo el cultivo con 1 ó 2 mL de aceite mineral para uso medicinal esterilizado en horno a -170°C por 1 ó 2 horas o en autoclave dos veces por 15 minutos a 121°C y almacenado a 4°C. El aceite impide la deshidratación y se inhibe el metabolismo y la velocidad de crecimiento por el impedimento del acceso al

oxígeno. Este método ha sido aplicado con resultados muy satisfactorios en hongos y levaduras, raramente en bacterias, aunque se tiene una reactivación lenta y el almacenamiento prolongado bajo condiciones adversas aumenta el riesgo de alteraciones y pérdida de viabilidad.

Un aspecto muy importante en los subcultivos continuos es impedir el proceso de deshidratación del medio utilizando tapas con cierre hermético, cubiertas con parafina y colocando varios de estos tubos en bolsas de plástico selladas.(4)

### ***2.5.2. Inmersión en aceite mineral (aceite de parafina de grado medicinal con densidad de 0.865-0.890)***

Muchas especies bacterianas son exitosamente preservadas por meses o años, por el método de inmersión en aceite mineral. Para este fin se cultiva el microorganismo en medio sólido en pico de flauta o en medio líquido y se lleva a incubación apropiada. Después de que se obtiene el crecimiento del microorganismo, se adiciona el aceite en forma aséptica formando una capa de unos 2mL (el agar en pico de flauta debe ser enteramente cubierto) con el fin de prevenir la deshidratación y reducir la actividad metabólica y el sobrecrecimiento del microorganismo. Las transferencias del medio de cultivo cubierto con aceite se hacen por punción y se siembran en un nuevo medio que se cubre con aceite estéril. Las desventajas de este método son las mismas del subcultivo ordinario. La contaminación de los cultivos generalmente ocurre por la no adecuada esterilización del aceite mineral. El aceite debe esterilizarse en un horno a 170°C durante dos horas (no recomienda autoclavar). Con esta

metodología la viabilidad de cepas de *Streptococcus* y *Actinobacillus* preservadas se prolonga, respectivamente por 1 año y 2-3 años. (tabla1).(6)

**Tabla 1. Expectativa de vida de algunas bacterias que se aíslan en cavidad oral preservadas por varios métodos.**

GÉNERO	SUBCULTIVO	ACEITE MINERAL	CONGELACIÓN	LIOFILIZACIÓN	CONGELACIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO
<i>Streptococcus</i>	1-2 mes	1 año		menor 30 años	Menor 30 años
<i>Lactobacillus</i>	Semanal			menor 30 años	Menor 30 años
<i>Actinobacillus</i>	Semanal	2-3 años		menor 30 años	Menor 30 años
<i>Actinomyces</i>	1 mes		2-3 años	menor 30 años	Menor 30 años
<i>Bacillus</i>	2-12 mes	1 año	2-3 años	menor 30 años	Menor 30 años
<i>Bacteroides</i>	Semanal		1 año	menor 30 años	Menor 30 años
<i>Bifidobacterium</i>	Semanal			menor 30 años	Menor 30 años
<i>Clostridium</i>	6-12 mes	1-2 años	2-3 años	menor 30 años	Menor 30 años
<i>Corynebacterium</i>	1-2 mes	1 año	1-2 años	menor 30 años	Menor 30 años
<i>Haemophilus</i>	Semanal	1 mes		menor 30 años	Menor 30 años
<i>Staphilococcus</i>	1-2 mes		1 año	menor 30 años	Menor 30 años

### ***Discos de Gelatina***

#### 2.5.3.1 Detalles del método

La preservación de una bacteria el discos de gelatina fue descrita por primera vez por *Stamp* en 1947.

El cultivo bacteriano es suspendido en gelatina disuelta o líquida, y las gotas de la suspensión se van solidificando en las cajas de petri. Las gotas son secadas o

liofilizadas, y colocadas sobre un desecante (silica gel). Este método no es particularmente adecuado para periodos muy largos, pero tiene una facilidad de uso y de alta producción cuantitativa de discos, el bajo riesgo de contaminación gracias al almacenamiento de éste a temperaturas bajas lo que impide que crezcan microorganismos oportunistas y la estabilidad de las características son otras de las grandes ventajas.

El crecimiento bacteriano, la suspensión de la gelatina, la distribución de las gotas en la caja de petri, el secado y liofilización de las gotas, su distribución en los viales y el almacenamiento son los pasos involucrados en la preparación de los discos. (12)

#### ***2.5.4. Congelación común***

La preservación de bacterias también se puede hacer por congelación en un rango de temperaturas de 0-20°C. En general, aunque este método no se recomienda para la preservación porque algunos componentes del medio de cultivo pueden causar daños en las células, está claro que algunas bacterias pueden ser mantenidas por este método de 6 meses a 2 años.

Ninguno de los métodos mencionados hasta este momento tiene aplicación universal ya que en la mayoría de los casos han sido usados en grupos particulares de microorganismos.(6)

Como métodos de preservación a largo tiempo están:

### **2.5.5 Ultracongelamiento**

La preservación por congelación ocasiona daños a las células tanto durante la etapa de congelamiento así como durante el proceso descongelamiento. Los daños son causados por la concentración de sales y otros metabolitos y/o por la formación de cristales de hielo que rompen la integridad celular. Estos efectos nocivos se pueden eliminar mediante el ajuste gradual de las tasas de congelamiento y descongelamiento y la adición de sustancias crioprotectoras a las células, dimetil sulfoxido o glicerol, para posterior sostenimiento a ultracongelación.

El ultracongelamiento se puede realizar con nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  con perlas de vidrio a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

El nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  es un método que ha mostrado excelentes resultados con microorganismos que no pueden ser preservados de otra manera. Entre otras bacterias cepas de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinobacillus* y *Actinomyces* han sido exitosamente preservadas durante mas de 30 años (Tabla 1). Las perlas de vidrio han reportado el mantenimiento de una gran variedad de bacterias con resultados satisfactorios en este se utiliza una suspensión de glicerol al 15% y perlas de vidrio las cuales se llevan a congelamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **2.5.6 Liofilización**

La liofilización o secado por congelación es un proceso de secado, en el cual el agua es sublimada directamente de un material previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Esta técnica se aplica cuando el producto en

solución es químico, biológico y térmicamente inestable en las condiciones normales de almacenaje.

Una de las mayores ventajas de la liofilización sobre otros métodos de preservación es que permite mantener la estabilidad genética, puede guardar la estabilidad en un periodo largo, la facilidad de procesar un líquido, la estabilidad mejorada de un polvo seco y, a menudo, la rápida disolución que ocurre después de la reconstitución de el liofilizado. La liofilización exitosa es posible para hormonas, péptidos, enzimas, esteroides, ácidos nucleicos, antibióticos, vacunas, bacterias, virus y tejidos biológicos. La estabilidad mejorada, por largo tiempo de almacenaje, de estos materiales es una de las grandes ventajas de este proceso.

De este modo la liofilización previene o limita la descomposición de la sustancia en solución acuosa, la disminución de la actividad de componentes activos y reacciones químicas entre dos o mas componentes en la mismo solución.

#### ***2.5.6.1 El proceso de la liofilización***

Este proceso se divide en tres partes principales:

La congelación del producto en solución , el secado primario(sublimación) y el secado secundario (post-secado).

#### **2.5.6.2 Congelación**

La congelación es una operación previa y obligatoria en todo proceso de liofilización esta debe efectuarse en equipos especiales, bien sea en armarios independientes o en las mismas placas de la cámara del liofilizador las cuales deben alcanzar temperaturas de  $-60^{\circ}\text{C}$ .

La ventaja de efectuar la precongelación en armarios separados del liofilizador es permitir independizar la operación de congelación de la liofilización, con lo que se facilita la organización del trabajo y permite obtener un mayor rendimiento del liofilizador, al introducir el producto ya congelado.

La congelación puede efectuarse de diferentes maneras, una congelación lenta es cuando se considera adecuado obtener cristales grandes de agua, la temperatura debe ir disminuyendo lentamente, de este modo se permite crecer a dichos cristales, con una pequeña área total; una congelación por enfriamiento muy rápido, el cual es un enfriamiento brusco usando nitrógeno líquido (-170°C), hielo seco ó freon comprimido (no recomendable por su efecto ecológico), donde se obtendrán pequeños cristales con el consiguiente aumento de superficie o área expuesta a la liofilización. Esta técnica también se usa cuando el producto se daña si se produce recristalización bajo condiciones moderadas de congelamiento.(11).

Otra forma de congelación es la congelación seriada la cual se define como la congelación separada de los componentes de un producto, capa tras capa; esta técnica puede aplicarse para anticipar la ocurrencia de una mezcla con un punto eutéctico muy bajo. La congelación por esferas consiste en gotear la solución a liofilizar dentro de un recipiente que contiene nitrógeno líquido (-170°C). Al subir la temperatura del nitrógeno se forman pequeñas burbujas de gas alrededor de las gotas que se están empezando a congelar, las cuales las mantienen flotando. Cuando las gotas están completamente congeladas lentamente van depositándose en el fondo del recipiente, durante la liofilización, el calor, se suministra también del fondo la "cama" de

esferas congeladas, sin embargo en este caso es importante el papel que juega el enfriamiento evaporativo.

Cuando sucede que durante el proceso de congelación normal un material tiene su estructura amorfa y esta estructura no es deseable, porque ocasiona mala reconstitución, es posible introducir un pase de calentamiento precediendo a la sublimación; esto es denominado: introducción del tratamiento termal durante la congelación.

El tratamiento térmico consiste de una primera congelación del material a una temperatura suficientemente baja y calentamiento gradual a una temperatura predeterminada, para permitir cristalizar a las formas meta estables y luego enfriar nuevamente a una temperatura apropiada antes de liofilizar. Grattlin and Deluca, encontraron que los antibióticos, pueden cambiar de estructuras amorfas a cristalinas, siguiendo esta técnica, un cambio de formas cristalinas; es también deseable cuando la estructura amorfa es demasiado higroscópica.(9)

#### 2.5.6.3 Secado primario o Sublimación

Durante la fase de sublimación del hielo, a fin de lograr un producto seco a partir de una masa congelada, tres son los parámetros sobre los que se pueda actuar para obtener una liofilización correcta. Estos son, la temperatura (de la placas calefactóricas, del producto y del condensador), la presión (vacío en cámara y en el grupo productor del vacío) y el tiempo.

Si bien estos tres parámetros, temperatura, presión y tiempo, pueden ser modificados independientemente, entre ellos están íntimamente relacionados, lo que no es posible

modificar uno, sin que vengan afectados los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente. ( 13)

Esta fase implica remover toda el agua de la preparación para poderla secar. La suspensión es inicialmente secada por evaporación, bajo la reducción de la presión mientras se centrifuga para evitar la emisión, de vapores durante la preparación, por la corta tasa de vapor que fluye durante este proceso es necesario minimizar los factores contaminantes tales como tapones de algodón o gasa, puesto que no permiten un absoluto filtrado. Este proceso se llevara con un mínimo de 3 horas. (12).

#### 2.5.6.4 Secado secundario o Post-secado.

Una vez eliminado todo el hielo del producto, la temperatura del mismo se acerca a la de las placas calefactoras. En este momento se inicia la desecación secundaria, que tiene por misión eliminar las últimas trazas de vapor de agua evaporando el agua no congelada ligada al producto en esta fase descenderemos la humedad final del producto hasta valores normales inferiores al 1%.

Esta es una de las características mas importantes de la liofilización, ya que permite alcanzar humedades residuales muy bajas, sin precisar temperaturas de tratamiento elevadas, por el contrario de otras técnicas de desecación. Ello es una consecuencia de la textura porosa y con una gran superficie creada por la sublimación del hielo la cual permite una extracción eficaz del agua hasta las zonas mas profundas del producto sin dañarlo.

El vacío juega un papel importante en esta fase . para la eliminación de las últimas trazas de agua, es preciso reestablecer un vacío elevado, cerrando la inyección de

aire en la cámara , ya que en esta fase no se precisa un gran aporte de calorías y normalmente con la que proporciona la radiación es suficiente.

La temperatura final admitida por el producto seco, acostumbra a ser superior a la temperatura admitida en su fase líquida, por lo que normalmente puede elevarse ésta al valor necesario a fin de reducir el tiempo de secado final. (13).

### 3. OBJETIVOS

#### **Objetivo general:**

Evaluar el efecto de los métodos de preservación en discos de gelatina y liofilización en leche descremada al 20% sobre el *Streptococcus mutans*.

#### **Objetivos específicos:**

1. Evaluar durante seis meses el comportamiento bioquímico de las cepas de *Streptococcus mutans* preservada en discos de gelatina y liofilización .
2. Determinar la viabilidad de la cepas de *Streptococcus mutans* preservadas en discos de gelatina y liofilización durante cuatro meses.
3. Analizar el riesgo de contaminación en la preservación en discos de gelatina y liofilización sobre el *Streptococcus mutans*.
4. Determinar la influencia del tiempo de reconstitución en la recuperación de *Srtreptococcus mutans* .

## 4. METODOLOGÍA

### ***4.1 Cepas:***

para este estudio se utilizaron 33 cepas de *Streptococcus mutans* previamente aisladas, identificadas y almacenadas en Leche descremada en el Centro de Investigaciones Odontológicas. Las 33 cepas mantenidas en leche descremada al 20% fueron descongeladas y sembradas en Agar sangre y en Agar Mitis salivarius e incubadas a 37°C durante 48 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub>.

Después del crecimiento en estos medios se tomaron colonias para hacer tinción de Gram y pruebas bioquímicas. ( *Hidrólisis de Esculina* , *Fermentación de Rafinosa, Melobiosa, Thealosa, Inulina, Manitol, Glucosa, Sorbitol, Ureasa* , *Rojo de metilo, VP e Hidrólisis de Arginina* ) y se cultivaron en caldo nutritivo hasta obtener una turbidez similar al tubo #2 de la escala de Mc Farland.

## **4.2Preservación:**

### ***4.2.1 Discos de gelatina:***

Inicialmente, se tomaron 300uL , de la cepas de *Streptococcus mutans* suspendidas en caldo nutritivo con una turbidez similar al tubo #2 de la escala de Mc Farland ( $6 \times 10^8$ ) y se mezclaron con 300uL de gelatina en estado líquido(30°C).

Después de este procedimiento se colocaron 20uL de esta mezcla en micropocillos de Elisa y se congelaron a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Todos estos procedimientos se realizaron en cámara de flujo laminar.

La gelatina en los micropocillos fué liofilizada en el liofilizador LABCONCO Freezone 4,5.(Fg1)

Los micropocillos (10 para cada cepa) se guardaron en tubos eppendorf de 2mL en los cuales previamente se había adicionada una capa de sílica gel activada por calor ( $160^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos) y un tapón de algodón encima de ésta.

Los micropocillos de gelatina liofilizados se conservaron en refrigeración a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de las evaluaciones.

#### ***4.2.1.1. Evaluación de la preservación en Discos de Gelatina***

Cada mes se tomó un micropocillo el cual se rehidrató con 1 mL de caldo nutritivo .

La cepa en resuspensión en caldo nutritivo se dejó en incubación durante 6 y 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

De estos dos tiempos se tomaron 10uL del caldo nutritivo y se sembraron en Agar sangre y Agar mitis salivarius , se incubaron durante 48 horas y se realizaron recuentos bacterianos y pruebas bioquímicas.

**Tabla 2. Identificación bioquímica para el *Streptococcus mutans*.**

<b>BIOQUÍMICAS</b>	<i>Streptococcus mutans</i>	<b>CONTROL POSITIVO</b>	<b>CONTROL NEGATIVO</b>
Hidrólisis de Esculina	Positivo	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Urea	Negativo	<i>Klebsiella</i>	<i>E.coli</i>
Fermentación de Rafinosa	Positivo	<i>E.coli</i>	<i>Shiguella</i>
Fermentación de Melobiosa	Positivo	<i>E.coli</i>	<i>Shiguella</i>
Fermentación de Trehalosa	Positivo	<i>E.coli</i>	<i>Shiguella</i>
Fermentación de Inulina	Positivo	<i>E.coli</i>	<i>Shiguella</i>
Fermentación de Manitol	Positivo	<i>E.coli</i>	<i>Shiguella</i>
Fermentación de Glucosa	Positivo	<i>E.coli</i>	<i>Shiguella</i>
Fermentación de Sorbitol	Positivo	<i>E.coli</i>	<i>Shiguella</i>
Hidrólisis de Arginina	Negativo	<i>Streptococcus piógenes</i>	<i>Shiguella</i>
Rojo de Metilo	Negativo	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i>
Voges Proskauer	Positivo	<i>Klebsiella</i>	<i>E.coli</i>

#### **4.2.2 Liofilización:**

La liofilización se realizó a partir de la suspensión de las 33 cepas de *Streptococcus mutans* en caldo nutritivo ajustado al patrón #2 de la escala de Mc Farland , logrando así una concentración de  $6 \times 10^8$  .

100uL de esta suspensión bacteriana se mezcló con 100uL de leche descremada estéril al 20%. Esta leche se preparó en agua estéril y luego se esterilizó a 116°C durante 20 minutos, evitando así el sobrecalentamiento que puede llevar a la caramelización de la leche. Estos microorganismos resuspendidos en la leche descremada al 20% se envasaron en tubos *ependorf* de 2mL. Estos tubos se llevaron por dos horas a congelación a -70°C.

#### ***4.2.2.1. Evaluación de la preservación en liofilización***

El producto liofilizado se reconstituyó con 1 mL de caldo nutritivo y se dejó en incubación durante 6 y 24 horas a 37°C . De estos dos tiempos se tomaron 10uL de caldo y se sembraron en Agar sangre y Agar Mitis salivarius y se incubaron a 37°C en cámara de CO2 por 48 horas, luego se realizaron las pruebas bioquímicas(Tabla 2) y recuentos bacterianos.

## 5. RESULTADOS

Este trabajo tuvo como fin determinar el efecto de los métodos de preservación en discos de gelatina y liofilización en leche descremada al 20% sobre 33 cepas de *Streptococcus mutans* durante cuatro meses.

De cada cepa se prepararon 10 viales en leche descremada al 20% para someter a liofilización y 10 discos de gelatina también para liofilizar. Los viales y discos de gelatina después de liofilizados fueron conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cada mes durante 4 meses se tomó un vial del liofilizado en leche descremada y un disco de gelatina liofilizado que fue reconstituido con 1 mL de caldo nutritivo y llevado a incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  primero a 6 horas y después durante 24 horas. Después de la incubación en estos dos tiempos se hicieron resiembras en Agar mitis salivarius y Agar sangre con el fin de determinar viabilidad (presencia o ausencia), contaminación, número de unidades formadoras de colonia y comportamiento bioquímico (*Hidrólisis de Esculina, Fermentación de Rafinosa, Melobiosa, Thealosa, Inulina, Manitol, Glucosa, Sorbitol, Urea, Rojo de metilo, VP e Hidrólisis de Arginina*).

## 5.1 Viabilidad

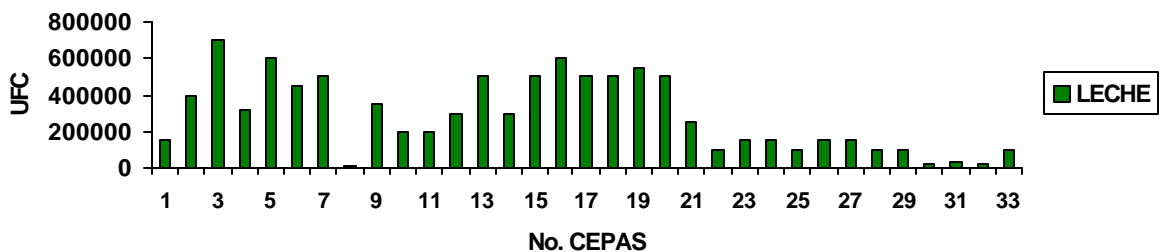
### 5.1.1 Primer mes de evaluación

#### 5.1.1.1. Liofilización en leche descremada al 20%

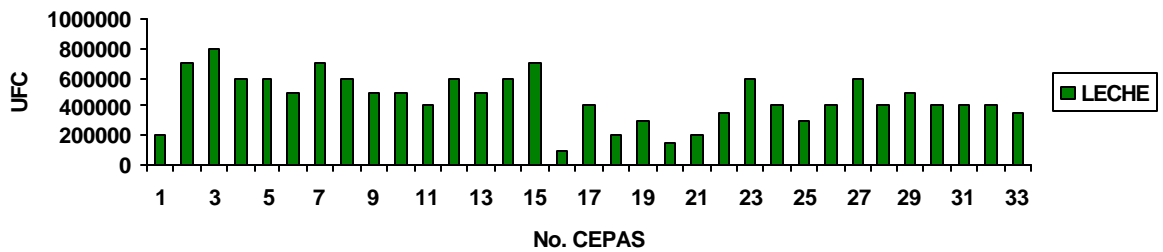
Al cabo de seis horas de reconstitución crecieron las 33 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 100% de viabilidad. En la figura 1 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Al cabo de 24 horas de reconstitución crecieron las 33 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 100% de viabilidad. En la figura 2 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.(Anexo3).

**Figura 1. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante un mes en leche descremada \* Antes de la siembra el liofilizado se reconstituyó con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 6 horas .**



**Figura 2. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante un mes en leche descremada \* Antes de la siembra el liofilizado se reconstituyó con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas .**



### 5.1.1.2. Discos de gelatina

Al cabo de seis horas de reconstitución crecieron 28 cepas, que indica un 84% de viabilidad. No se presentó ninguna contaminación. En la figura 3 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Al cabo de 24 horas de reconstitución crecieron todas las 33 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 100% de viabilidad. En la figura 4 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Figura 3. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante un mes en discos de gelatina. \* Antes de la siembra los discos de gelatina se reconstituyeron con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 6 horas .

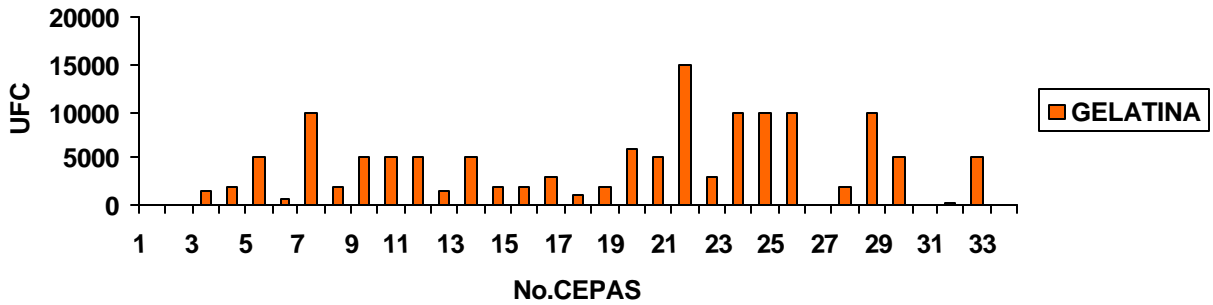
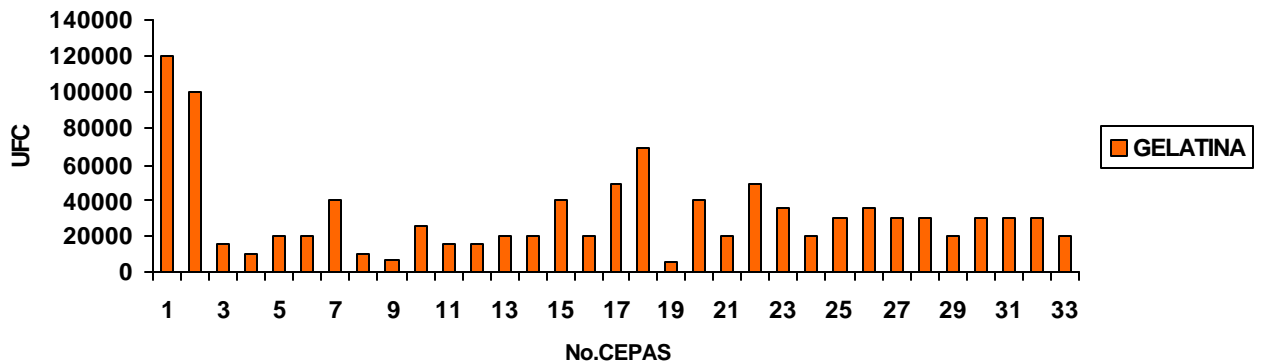


Figura 4 : Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante un mes en discos de gelatina. \* Antes de la siembra los discos de gelatina se reconstituyeron con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas .



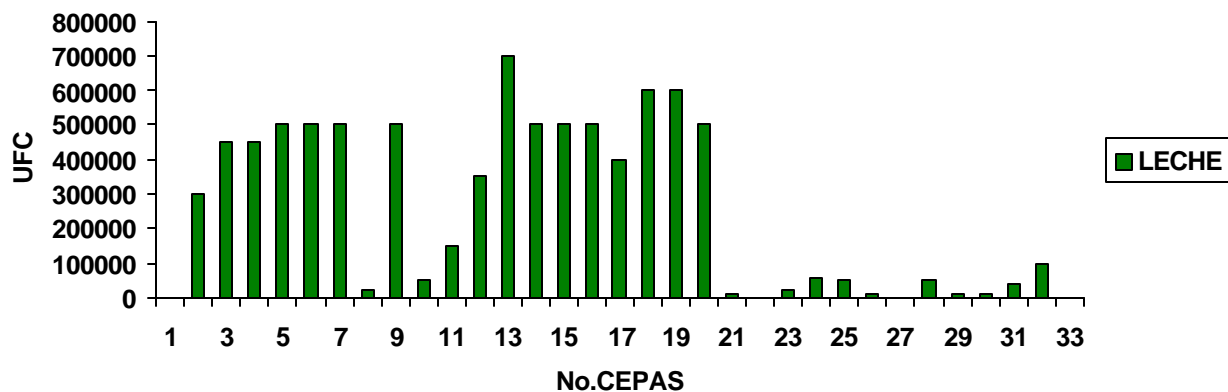
## 5.1.2. Segundo mes de evaluación

### 5.1.2.1. Liofilización en leche descremada al 20%

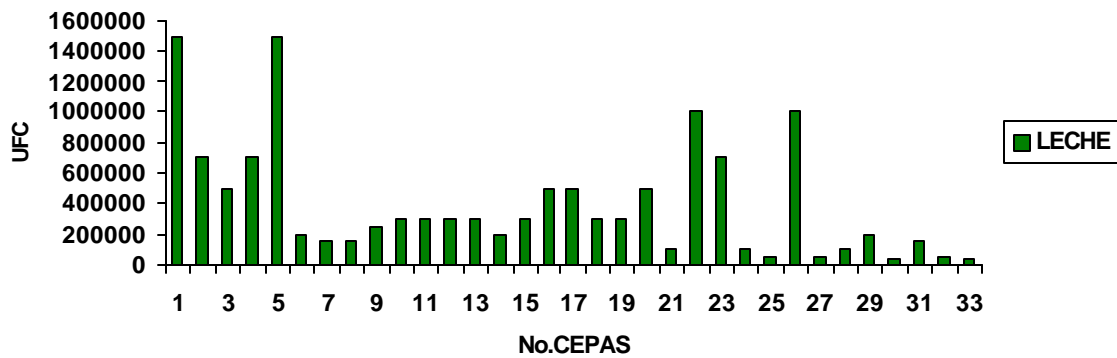
Al cabo de seis horas de reconstitución crecieron 29 cepas, sin contaminación, lo que indica un 87% de viabilidad. En la figura 5 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Al cabo de 24 horas de reconstitución crecieron las 33 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 100% de viabilidad. En la figura 6 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Figura 5. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante dos meses en leche descremada. \* Antes de la siembra el liofilizado se reconstituyó con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 6 horas .



**Figura 6. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante dos meses en leche descremada . \* Antes de la siembra el liofilizado se reconstituyó con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas .**



### 5.1.2.2. Discos de gelatina

Al cabo de seis horas de reconstitución crecieron 21 cepas, que indica un 63% de viabilidad. No se presentó ninguna contaminación. En la figura 7 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Al cabo de 24 horas de reconstitución crecieron todas las 26 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 78% de viabilidad. En la figura 8 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Figura 7. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante dos meses en discos de gelatina. \* Antes de la siembra los discos de gelatina se reconstituyeron con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 6 horas .

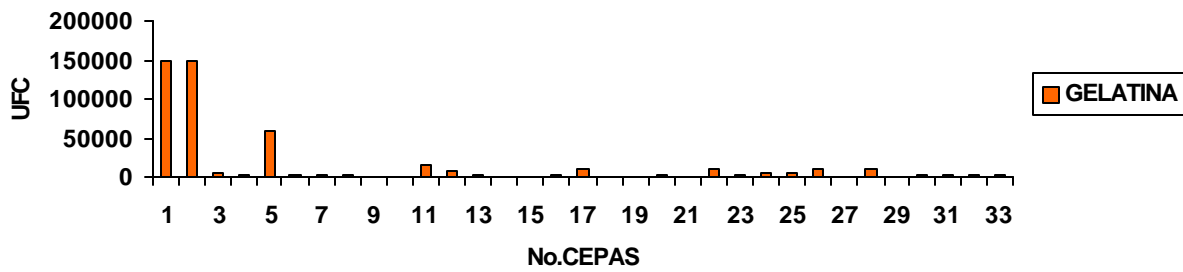
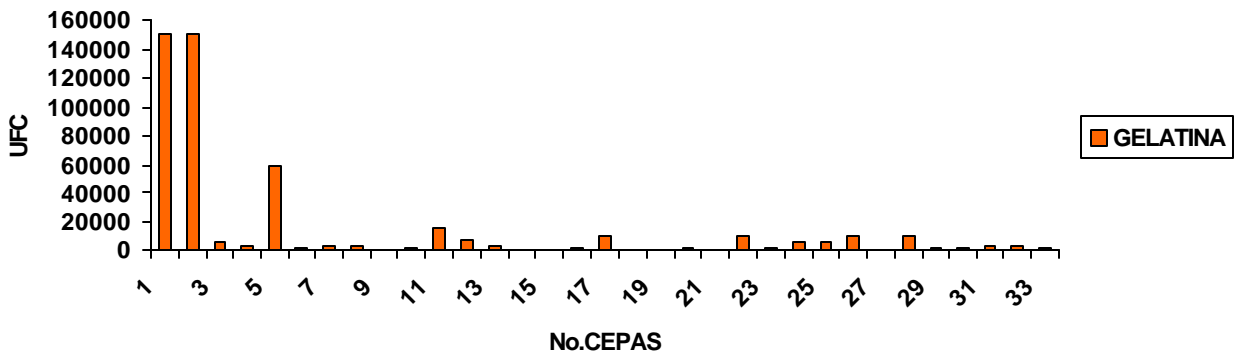


Figura 8. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante dos meses en discos de gelatina. \* Antes de la siembra los discos de gelatina se reconstituyeron con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas .



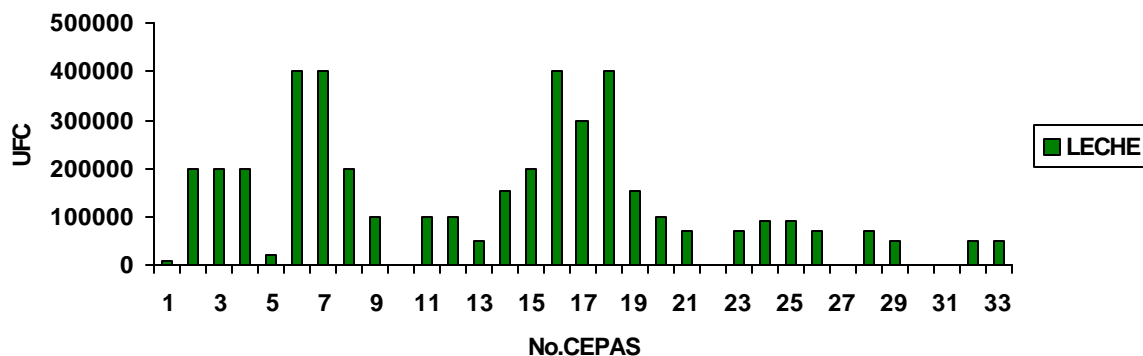
### 5.1.3 Tercer mes de evaluación

#### 5.1.3.1. Liofilización en leche descremada al 20%

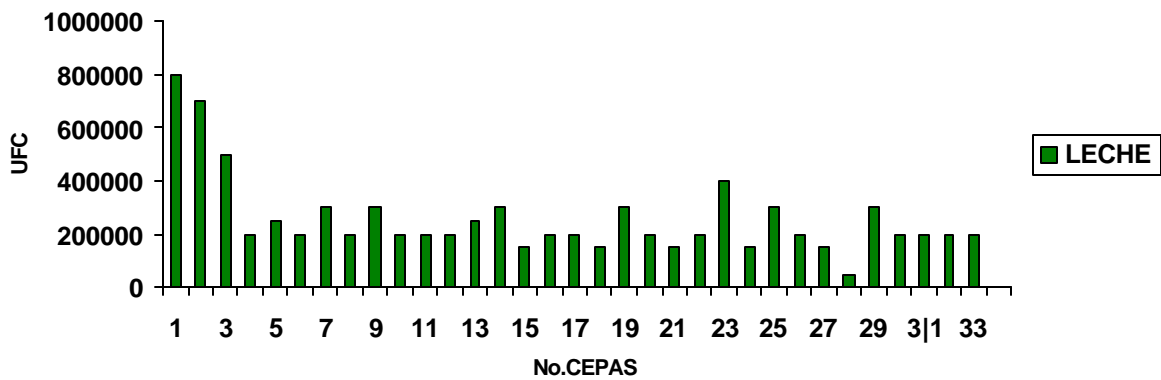
Al cabo de seis horas de reconstitución crecieron 28 cepas, sin contaminación, lo que indica un 84% de viabilidad. En la figura 9 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Al cabo de 24 horas de reconstitución crecieron las 33 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 100% de viabilidad. En la figura 10 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

**Figura 9. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante tres meses en leche descremada . \* Antes de la siembra el liofilizado se reconstituyo con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 6 horas .**



**Figura 10. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante tres meses en leche descremada . \* Antes de la siembra el liofilizado se reconstituyo con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas .**



### 5.1.3.2 Discos de gelatina

Al cabo de seis horas de reconstitución crecieron 17 cepas, que indica un 51% de viabilidad. No se presento ninguna contaminación. En la figura 11 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Al cabo de 24 horas de reconstitución crecieron 28 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 84% de viabilidad. En la figura 12 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa

Figura 11. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante tres meses en discos de gelatina. \* Antes de la siembra los discos de gelatina se reconstituyeron con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 6 horas .

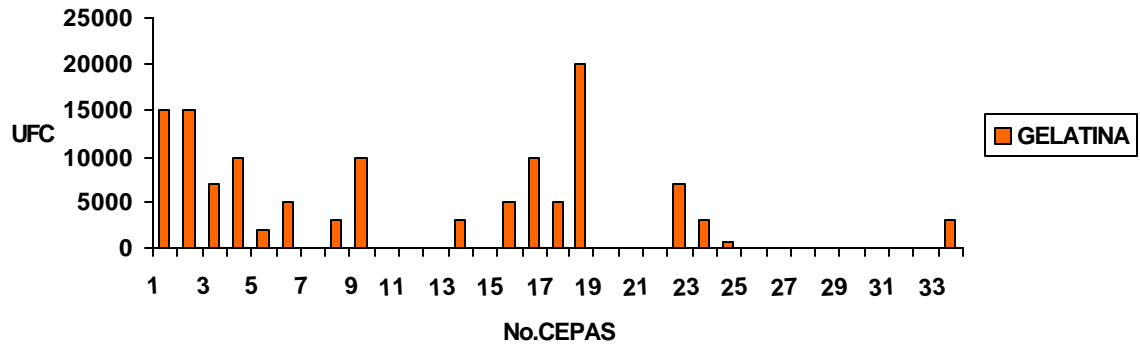
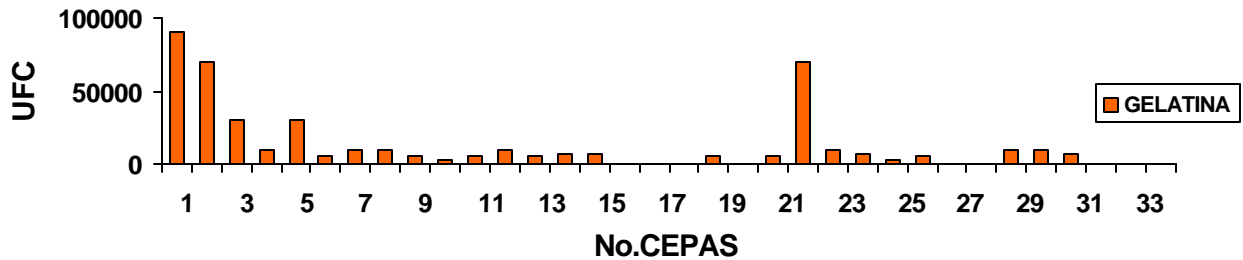


Figura 12. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante tres meses en discos de gelatina. \* Antes de la siembra los discos de gelatina se reconstituyeron con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas .



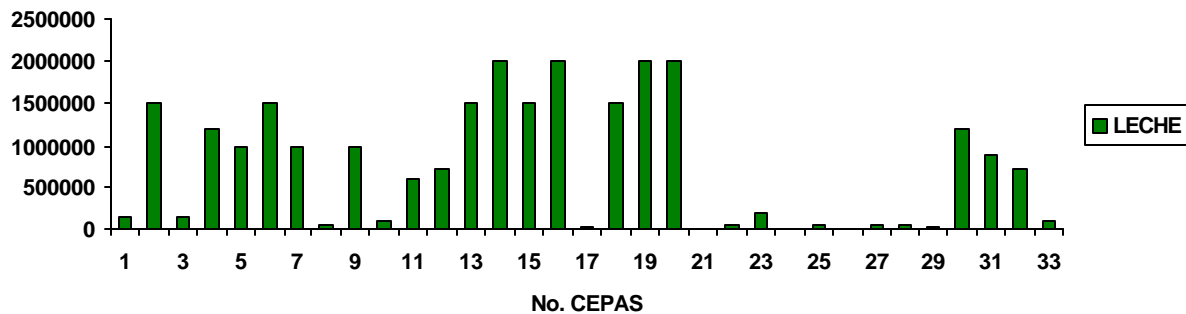
## 5.1.4 Cuarto mes de evaluación

### 5.1.4.1. Liofilización en leche descremada al 20%

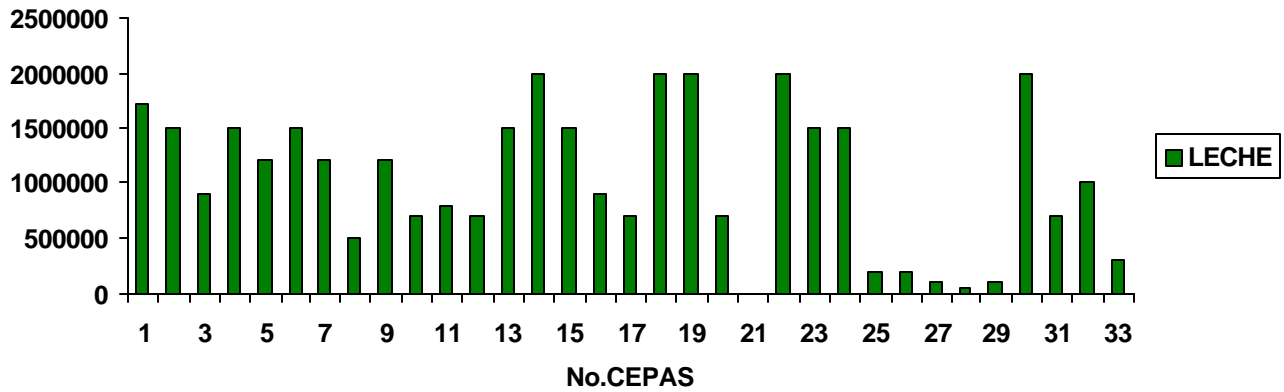
Al cabo de seis horas de reconstitución crecieron las 30 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 90% de viabilidad. En la figura 13 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Al cabo de 24 horas de reconstitución crecieron las 32 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 96% de viabilidad. En la figura 14 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

**Figura 13. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante cuatro meses en leche descremada. \* Antes de la siembra el liofilizado se reconstituyó con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 6 horas .**



**Figura 14. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante cuatro meses en leche descremada. \* Antes de la siembra el liofilizado se reconstituyo con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas .**



#### 5.1.4.2. Discos de gelatina

Al cabo de seis horas de reconstitución crecieron 24 cepas, que indica un 72% de viabilidad. No se presentó ninguna contaminación. En la figura 15 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Al cabo de 24 horas de reconstitución crecieron todas las 25 cepas evaluadas, sin contaminación, lo que indica un 75% de viabilidad. En la figura 16 se indica el número de unidades formadoras de colonia de cada cepa reconstituida.

Figura 15. Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante cuatro meses en discos de gelatina. \* Antes de la siembra los discos de gelatina se reconstituyeron con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 6 horas .

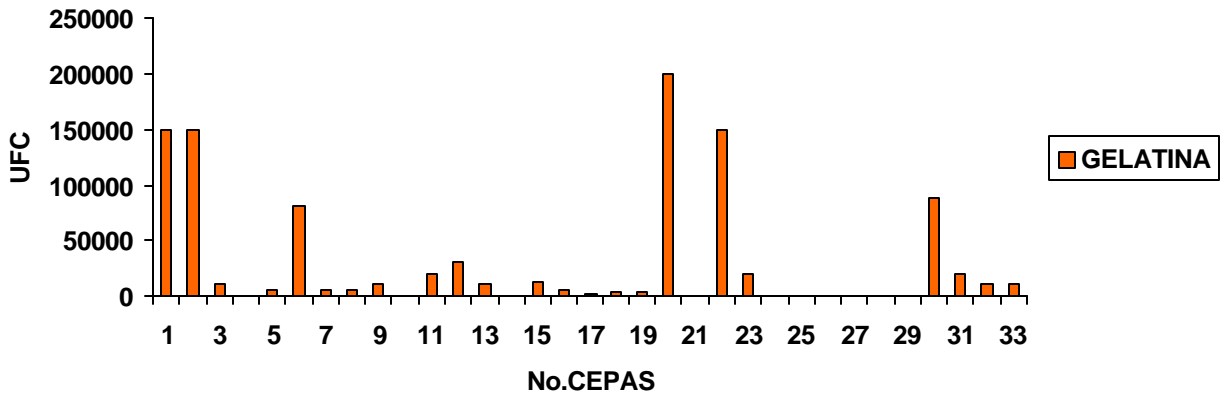
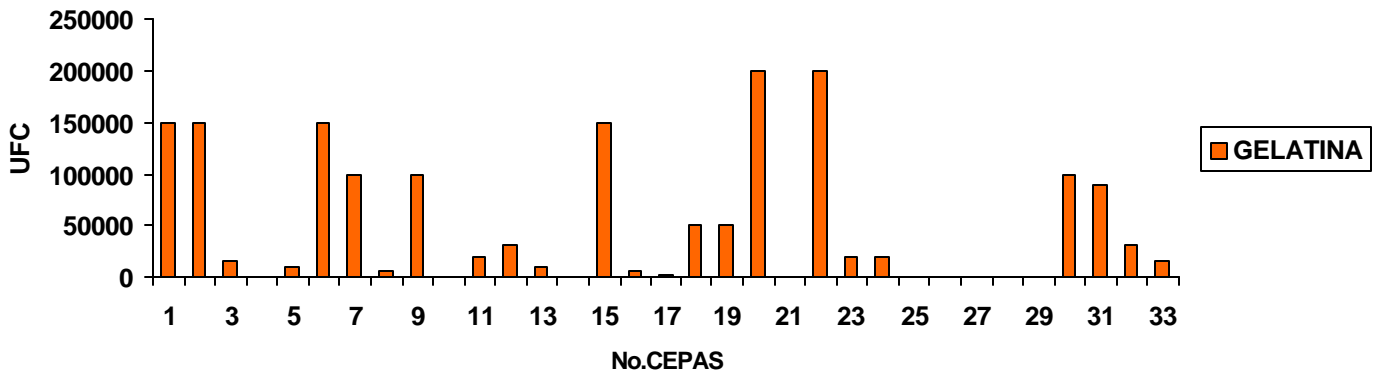


Figura 16 : Recuperación de UFC de cepas de *S.mutans* preservadas durante cuatro meses en discos de gelatina. \* Antes de la siembra los discos de gelatina se reconstituyeron con caldo nutritivo y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas .



**Tabla 5. Resumen de los resultados finales**

MES	6 HORAS						24 HORAS					
	UFC		VIABILIDAD %		CONTAMINACION		UFC		VIABILIDAD %		CONTAMINACION	
	L	G	L	G	L	G	L	G	L	G	L	G
1	278984	4606	100	84	0	0	465151	34848	100	100	0	0
2	255757	2369	87	63	0	0	395000	15506	100	78	0	0
3	135454	3969	84	55	0	0	206060	12939	100	76	0	0
4	896969	75642	90	72	0	0	1136000	53975	96	75	0	0

## 5.2.Comportamiento bioquímico

Todas las 33 cepas de *S. mutans* preservadas por los dos sistemas, mantuvieron el mismo comportamiento bioquímico (*Hidrólisis de Esculina, Fermentación de Rafinosa, Melobiosa, Thealosa, Inulina, Manitol, Glucosa, Sorbitol, Urea negativa, Rojo de metilo negativo, VP positivo y no Hidrólisis de Arginina*) al cabo del primer, segundo, tercer y cuarto mes de conservación con relación al comportamiento bioquímico original (antes de someter a preservación).

### 5.3 Análisis estadístico:

El análisis estadístico (Tabla 6), demostró que la liofilización en leche descremada al 20% durante cada uno de los 4 meses fue significativamente superior a la preservación en discos de gelatina.

**Tabla 6: Análisis estadístico**

#### 6 HORAS

MES	CHI	P	PROMEDIO		VARIANZA		DESVIACION	
			LECHE	GELATINA	LECHE	GELATINA	LECHE	GELATINA
1	151.3	0.001	278984.84	4606	4363E+10	7465E+0.7	208868	8645.5
2	123.4	0.001	255757.57	2369.7	5.862E+10	1.256E+0.7	242110	3544.052
3	91.67	0.001	135454.545	3969.697	1.548E+10	2.791E+0.7	124425.995	5282.547
4	167.05	0.001	896969.69	75642.42	4921E+11	6.811E+10	701522.8	260971.8

#### 24 HORAS

MES	CHI	P	PROMEDIO		VARIANZA		DESVIACION	
			LECHE	GELATINA	LECHE	GELATINA	LECHE	GELATINA
1	98.5	0.001	465151	34848.4	2.617E+10	6.054E+0.8	161769.922	4283
2	142.94	0.001	395000	15506.061	1.482E+11	1.373E+0.9	384963.472	6451
3	129.3	0.001	206060.60	12939.4	3.104E+10	4.765E+0.8	176191.3	3799.9
4	158.6	0.001	1.136E+0.6	53975.7	4.119E+11	4.247E+0.9	641808.082	11345.112

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La realización de muchas actividades en microbiología , después del proceso de aislamiento e identificación de los microorganismos , depende de la adecuada preservación de estos. La preservación de los microorganismos es extremadamente importante y debe garantizar el mantenimiento del organismo en estado inactivo, puro, sin variaciones ni mutaciones, es decir en una condición muy cercana a la original. A pesar de tenerse a disposición una amplia variedad de técnicas para la preservación de las cepas bacterianas, sigue siendo dificultoso elegir el método mas apropiado para la preservación mas apropiado para la conservación de una especie bacteriana en particular. La escasa información existente sobre la utilidad de los métodos de preservación en la conservación de bacterias de procedencia oral, en particular de *Streptococcus mutans* , condujo a plantear este trabajo, con el fin de tener la experiencia necesaria para hacer el mejor aprovechamiento de los microorganismos confinados a un servicio de colección de cepas o cepario.

Este trabajo señala la utilidad y el rendimiento de la preservación por liofilización en leche descremada al 20% y en discos de gelatina , durante cuatro meses, sobre 33 cepas de *Streptococcus mutans*. La preservación en discos de gelatina se describe, básicamente por su rendimiento económico y practicidad, como una técnica

particularmente propicia para preservar cepas bacterianas en gran cantidad (4),(6),(12). La idea al utilizar esta técnica en este trabajo, era obtener de una manera rápida muchas replicas del microorganismo preservado. Con este fin se inicio con la siembra de la mezcla, microorganismos disueltos en gelatina, en forma de pequeñas gotas (20uL) sobre cajas de Petri, para posterior congelación y liofilización. De esta manera obtendríamos múltiples discos de gelatina de cada cepa preservada. Sin embargo, cuando procedimos a desprender los discos de la caja de Petri nos encontramos con el inconveniente de no poder despegarlas, y en algunos casos rompimiento de los mismos. Los manuales de preservación recomiendan para este procedimiento el uso de cajas de Petri especialmente diseñadas para este fin (4), (12). Ante la imposibilidad de obtener las cajas de Petri adecuadas se decidió utilizar para este método, micropocillos de Elisa. Los resultados utilizando los micropocillos fueron adecuados, con la limitante de obtener menos replicas de los microorganismos. De esta manera la mezcla de los microorganismos mas gelatina se aplico sobre los micropocillos, y fueron llevados a congelación y posterior liofilización. Los micropocillos con mezcla liofilizada, fueron guardados en tubos epperdorf de 2 mL con silica gel para evitar la hidratación del liofilizado. Este micropocillo resultó muy practico y útil, ya que sobre el se depositó el caldo nutritivo para la recuperación de la bacteria preservada.

La liofilización con leche descremada al 20% resulto en este estudio ser mejor que los discos de gelatina para la preservación de 33 cepas de *Streptococcus mutans* durante cada uno de los cuatro meses, ya que permitió una mayor recuperación del microorganismos(mayor viabilidad y mayor número de unidades formadores de

colonias)( $p < 0.001$ ). En la actualidad existe muy poca experiencia en la preservación de cepas de *S. mutans*; al contrario se existe mayor experiencia con cepas de *S. pneumoniae* (11). El Dr. George Siberry y colaboradores (11) evaluaron diferentes métodos, medios de cultivo y condiciones de almacenamiento para la preservación de 5 cepas con serotipo diferentes de *S. pneumoniae*. Estas bacterias fueron preservadas en diferentes medios con posterior almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$  (durante 16 meses), por la liofilización y desecación en arena (durante 68 meses). Independientemente del medio usado el almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  solo permitió el crecimiento de bacterias hasta el cuarto mes. En cambio las cepas almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  fueron viables durante los 16 meses de evaluación. Las cepas preservadas por liofilización y desecación en arena. Y mantenidas a  $4^{\circ}\text{C}$  fueron viables durante 68 meses de evaluación. En conclusión, la liofilización con posterior almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  dan las mejores condiciones para la preservación de microorganismos por largos periodos de tiempos(12). Aunque este trabajo solo se ha realizado hasta el momento durante 4 meses, la liofilización y el posterior mantenimiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  han permitido el mejor mantenimiento de las cepas objeto de estudio (12).

Otro de los objetivos de este trabajo fue determinar la susceptibilidad de estos métodos a la contaminación por microorganismos externos y el tiempo de incubación mas adecuado para la recuperación de las cepas ya preservadas. La no contaminación en ninguna de las cepas preservadas por los dos métodos señala el adecuado procedimiento seguido. Para la mejor recuperación de las cepas preservadas, se

recomienda prehidratar el preservado con caldo nutritivo e incubar durante algún tiempo para permitir el restablecimiento de las condiciones fisiológicas. Por esto se evaluaron dos tiempos de incubación en caldo nutritivo, a las 6 y 24 horas. La incubación durante 24 horas permitió la mejor recuperación de las cepas preservadas, representando en mayor viabilidad y mayor número de unidades formadores de colonia, en los dos métodos de preservación evaluados.

Uno de los aspectos que contribuyen a robustecer el método de preservación a elegir, es la conservación del comportamiento bioquímico, a través del tiempo, por parte de las cepas preservadas. En este estudio ninguna de las cepas preservadas por los dos métodos presento cambios en el comportamiento bioquímico.

## 7.CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en el estudio sobre la comparación de dos métodos de preservación confirmaron que la liofilización en leche descremada al 20% y el posterior almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  es el método ideal para la conservación de las 33 cepas de *Streptococcus mutans* utilizadas en este estudio.
2. La liofilización en leche descremada al 20% demostró que el conteo de UFC en los cuatro meses de experimentación fue mas representativo que el obtenido en los discos de gelatina.
3. La liofilización de leche descremada al 20% se constituye en un método óptimo y fácil de realizar para la preservación de *Streptococcus mutans*.
4. El periodo de incubación a las 24 horas de la reconstitución es estadísticamente mas significativo( Chi cuadrado = 0.001) que en 6 horas de incubación para la recuperación bacteriana y posterior conteo de las UFC en Agar Mitis salivarius .

5. La dificultad en la realización del método de preservación para discos de gelatina constituye una técnica de muy alto costo y un gran riesgo de contaminación.

## **RECOMENDACIONES**

1. Comparación de la liofilización con otros métodos de preservación como glicerol o congelación común para diferentes microorganismos
2. En otros estudios determinar la temperatura adecuada en la cual se puedan conservar otros microorganismos orales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BURNETT G.W, Schuster G.S. Microbiología oral y enfermedad infecciosa. Buenos Aires. Editorial medica Panamericana. 1982.
2. ESCOBAR DE RICO Myriam. Prácticas de laboratorio: Microbiología de la cavidad oral. Centro editorial Javeriano, CEJA, Bogotá 1999.
3. ESTUPIÑÁN G Mabel, Galindo Sandoval Adriana. Colonización por Streptococcus mutans en cavidad oral de niños en edad preescolar en Turmequé (Boyacá). Pontificia universidad Javeriana, Bogotá D.C 2000.
4. FLOCCARI ME. Métodos de conservación de cultivos bacterianos . Laboratorio de genética bacteriana ; departamento de Química Biológica, Facultad de ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos Aires. Revista argentina de Microbiología 1998; 30: 42-51.
5. GAMBOA Jaimes Freddy O, Bustillo Jairo, Gonzáles Felipe. Estrategias para la preservación de microorganismos aislados de la cavidad oral. Centro de investigaciones odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá,2000.
6. GAMBOA Jaimes F, Bustillo Rojas J, Gonzáles Vanegas Felipe. Estrategias para la preservación de microorganismos aislados de la cavidad oral., Univers Odont, Jun 2001;21(44):68-73.

7. GAMBOA Martínez Luis F. Epidemiología de la caries. Univers Odont, Pontificia universidad Javeriana, Bogotá. May 2000;20(Supl 1):13-17.
8. KONEMAN E, Alen D, Dowel R. Diagnostico microbiologico . Editorial medica Panamericana.1997
9. LENNETTE E, Balows A, Hauser W, Shadomy J. Microbiología clínica. Cuarta edición. Editorial panamericana .American society for Microbiology, Washington, D.C, 1993.
10. LIOFILIZACIÓN de productos farmacéuticos 1983.
11. Mc. FADDIN Jean. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias de importancia clinica. Editorial Panamericana. 1980.
12. NERAZO Acuña Benjamín, Castro Leal Mario, Castro Velasco Edison, Cevallos Arbelaez Mauricio, Del Rio Lucrecia. Control biológico del *Streptococcus mutans*. Facultad de Odontología, Unidad de post-grado-Educación continuada y programas especiales, Bogotá .Diciembre 1988.
13. SIBERRY G, K.N.Brahmadathan, Rajeswar Pardian,M.K.Lalitha, Marck C. Steinhoff, T.Jacob John.Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics, Bulletin of the World health Organization, 2001,79(1).
14. SNELL JJS, Rude RH, Jones D et al. maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods, edition #1, Orlando-Florida 32887: Academic Press INC, 1984, 24-45.

15. TELSTARSA SA, departamento técnico . Técnicas de vacío y control:  
apuntes de liofilización. Madrid-España 1985,5-37.

16. ZHANG Jian-Zhong, Jian Xiu-Gao, Chen Jing-jing, Sun Zhao-jun, Sheng  
Tao. Diarrhea Disease Lab, Institute of epidemiology and Microbiology,  
Chinese academy of preventive Medicine, Beijing 1998 .China.

## ANEXO 1

### PRUEBAS BIOQUÍMICAS

#### 1. FERMENTACIÓN DE AZUCARES

##### FUNDAMENTO:

Las bacterias a través de sus enzimas extracelulares transforman los complejos carbohidratos en azúcares simples que aprovechan como fuente energética. Cada bacteria fermenta un carbohidrato llevando a productos intermedios y finales, como Ácido láctico y acético, alcohol etílico, bióxido de Carbono e Hidrógeno.

Para realizar esta prueba se utilizan caldos con carbohidratos a los que se les incluye un indicador de cambio de color, el ataque de los azúcares en estos medios conduce a la acidificación con la producción o no de gas.

Los azúcares más utilizados son : glucosa, manitol, sorbitol, trehalosa, melobiosa, rafinosa, inulina, entre otros.

Se utilizó como base: Caldo nutritivo

COMPONENTES	CANTIDAD
Extracto de carne	30 gramos
Peptona	5.0 gramos

## **PREPARACIÓN**

- Disolver 18 gr por 1000mL de agua destilada
- Agregar el azúcar al 1%
- Adicionar 0.018gr de rojo de Fenol a 1000mL de solvente
- servir 4Ml en cada tubo
- Autoclavar a 121°C por 10 minutos

## **INTERPRETACIÓN**

Amarillo = Positivo

Violeta = Negativo

## **2. CATALASA**

### **FUNDAMENTO**

Esta enzima se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, la excepción principal es el *Streptococcus*; este posee peroxidasa.. Por lo general los organismos que no poseen citocromo carecen también de la enzima y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, éste si se deja acumular es tóxico para las bacterias y provoca su muerte, la catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (gas liberado, y producción de burbujas).

Para la realización de esta prueba se agrega a la bacteria previamente recogida con un palillo de madera y lista en un portaobjetos peróxido de hidrógeno al 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) observándose la producción o no de burbujas.

## REACTIVOS

COMPONENTES	CANTIDAD
Peroxido de hidrógeno, 30%	30mL para 100mL
Buffer fosfato, pH:7	1.361gr de (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Y 1.420gr de (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) en 1000mL de agua destilada
Tween 80, 10%	1mL de Tween 80 para 10 mL de agua destilada

## INTERPRETACIÓN

Producción de burbujas = Positivo

No producción de burbujas = Negativo

## 3. UREA

### FUNDAMENTO

En este medio de cultivo solo puede crecer los microorganismos que son capaces de utilizar la urea como única fuente de carbono, aquellos microorganismos que utilizan urea producen un viraje rojo, gracias a la producción de amoníaco el cual por su basicidad indica el cambio de color y enturbamiento del medio.

El caldo inicial es claro y amarillo.



### PREPARACIÓN

- Esterilizar agua destilada a 121°C por 15 minutos
- Disolver 38.5gr en 1000mL de agua

- Servir en los tubos

## **INTERPRETACIÓN**

Color rojo = Positivo

Color Amarillo = Negativo

## **4.RMVP**

### **FUNDAMENTO DEL ROJO DE METILO (RM)**

Esta prueba diferencia a los organismos capaces de producir grandes cantidades de ácido de la glucosa y que hacen descender el pH por debajo de 4.4, de aquellos que no producen descenso del mismo.

### **FUNDAMENTO DE VOGES-PROSKAUER(VP)**

La reacción de Voges-Proskauer se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoína), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis.

## **REACTIVOS**

<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD</b>
Peptona	5gramos
Glucosa	5gramos
Tampón fosfato	5gramos

## **INTERPRETACION**

### **RM Y VP**

Positivo = color rojo a naranja

Negativo = color amarillo.

## **5. HIDRÓLISIS DE LA ARGININA**

### **FUNDAMENTO**

Es un medio de cultivo de ensayo para la demostración de Ornitinadecarboxilasa y de Arginina-dihidrolasa, en el marco de la identificación bioquímica.

Este caldo contiene Arginina como sustancia reaccionante y púrpura de Bromocresol como indicador de pH. En primer lugar la glucosa es degradada a ácido. A un pH inferior a 5.6, vira a amarillo el color del indicador de pH.

Después las bacterias Arginina-dihidrolasa positivas, producen un nuevo aumento del pH debido a la degradación de Arginina. Este ensayo solamente es realizable con microorganismos que pueden utilizar la glucosa con formación de ácido. El caldo preparado y listo para el uso es claro y de color violeta.

## REACTIVOS

COMPONENTES	CANTIDAD
Peptona de carne	5 gramos
Extracto de levadura	5 gramos
Púrpura de Bromocresol	0.01 gramos
Rojo cresol	0.005 gramos

## PREPARACIÓN

- Disolver el caldo Moeller decarboxilosa por 1000mL
- Adicionar el aminoácido al 2%
- Servir en tubos
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

## INTERPRETACIÓN

Positivo = violeta

Negativo = amarillo

## 6. AGAR BILIS ESCULINA

## **FUNDAMENTO**

El uso mayoritario del agar Bilis esculina es para diferenciar entre Enterococos/Estreptococos Grupo A y Streptococcus no grupo D.

Los Enterococos/Estreptococos Grupo A y Streptococcus no grupo D hidrolizan la esculina para formar esculetina y dextrosa. La esculetina se combina con el citrato férrico del medio formando un complejo marrón oscuro o negro que indica un resultado positivo. Las sales biliares inhibirán las bacterias gram-positivas que no sean Enterococos/Estreptococos grupo D.

## **REACTIVOS**

<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD</b>
Peptona	8 gramos
Sales biliares	20 gramos
Citrato férrico	0.5 gramos
Esculina	1 gramo
Agar	15 gramos

## **PREPARACIÓN**

- Disolver 44.5 gramos en 1000mL
- Servir en tubos de ensayo
- Llevar a esterilizar a 121°C por 15 minutos
- Dejar enfriar en posición inclinada

## **INTERPRETACIÓN**

Positivo = negro a castaño

Negativo = Incoloro.

### ANEXO 3

**Tabla3: UFC en leche descremada al 20%**

		6 HORAS				24 HORAS			
CEPA	MES	1	2	3	4	1	2	3	4
1		150000	0	1000000	1500000	200000	1500000	800000	1700000
2		400000	300000	200000	1500000	700000	700000	700000	1500000
3		700000	450000	200000	1200000	800000	500000	500000	900000
4		320000	450000	200000	1200000	600000	700000	200000	1500000
5		600000	500000	200000	1000	600000	1500000	250000	1200000
6		450000	500000	400000	1500000	500000	200000	200000	1500000
7		500000	500000	400000	1000000	700000	150000	300000	1200000
8		8000	25000	200000	500000	600000	150000	200000	500000
9		350000	500000	100000	100000	500000	250000	300000	1200000
10		200000	50000	0	100000	500000	300000	200000	700000
11		300000	150000	100000	600000	400000	300000	200000	800000
12		500000	350000	100000	700000	600000	300000	200000	700000
13		300000	700000	50000	1500000	500000	300000	200000	1500000
14		300000	500000	150000	2000000	600000	200000	250000	2000000
15		500000	500000	200000	1500000	700000	300000	300000	1500000
16		600000	500000	400000	2000000	500000	500000	150000	900000
17		500000	400000	300000	2000000	400000	500000	200000	700000
18		500000	600000	400000	1500000	200000	300000	200000	2000000
19		550000	600000	150000	2000000	300000	300000	150000	2000000
20		500000	500000	100000	2000000	150000	500000	300000	700000
21		250000	10000	70000	0	200000	100000	200000	0
22		100000	0	0	500000	350000	1000000	150000	2000000
23		150000	25000	70000	200000	600000	700000	200000	1500000
24		150000	60000	90000	0	400000	100000	400000	1500000
25		100000	50000	90000	0	300000	50000	150000	2000000
26		150000	10000	70000	400000	400000	1000000	300000	2000000
27		150000	0	0	50000	600000	50000	200000	1000000
28		100000	50000	70000	400000	400000	100000	150000	50000
29		100000	10000	50	20000	500000	200000	50000	100000
30		20000	10000	0	1200000	400000	40000	300000	2000000
31		35000	40000	0	900000	400000	150000	200000	700000
32		20000	100000	50000	700000	400000	50000	200000	1000000
33		100000	0	50000	100000	350000	45000	200000	300000

## ANEXO 4

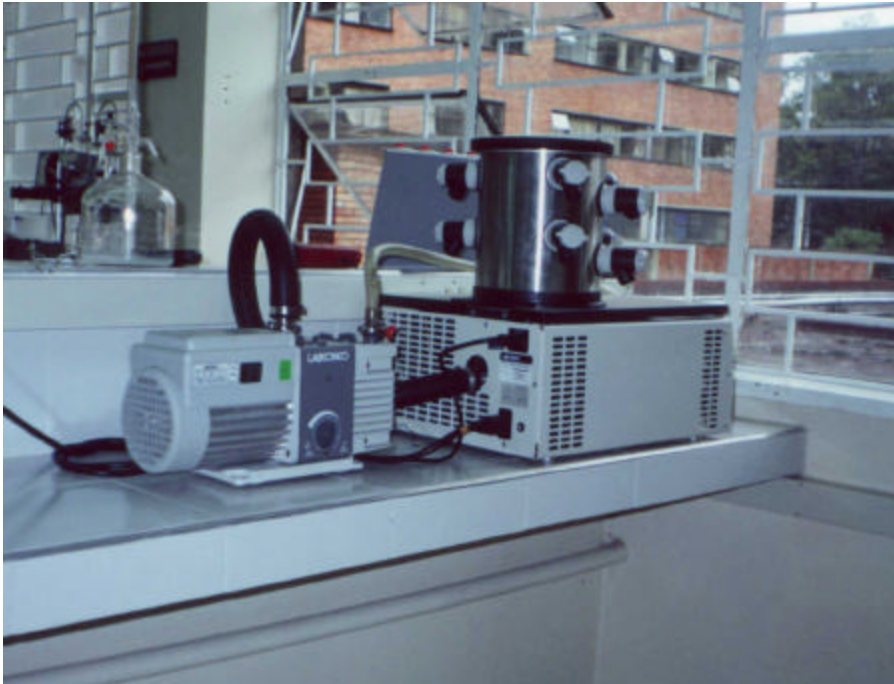
**Tabla 4. UFC en Discos de Gelatina**

		6 HORAS				24 HORAS			
CEPA	MES	1	2	3	4	1	2	3	4
1		0	0	15000	150000	120000	150000	90000	150000
2		0	0	15000	150000	100000	150000	70000	150000
3		500	0	7000	100000	15000	5000	35000	150000
4		400	1000	1000	0	10000	3000	10000	0
5		5000	10000	2000	5000	20000	60000	30000	100000
6		600	1000	5000	80000	20000	2000	3000	150000
7		10000	0	0	5000	40000	3000	10000	100000
8		2000	30000	30	5000	10000	3000	10000	60000
9		3000	0	10000	10000	7000	0	5000	100000
10		5000	1000	0	200	25000	700	3000	2000
11		5000	5000	0	20000	15000	15000	5000	20000
12		2000	1500	0	30000	15000	7000	10000	30000
13		2000	15000	3000	10000	20000	30	5000	10000
14		2000	0	0	0	20000	0	7000	0
15		2000	0	5000	120000	40000	0	7000	150000
16		3000	1000	10000	5000	20000	2000	0	5000
17		1000	500	5000	2000	50000	10000	0	2000
18		2000	0	10000	4000	70000	0	0	50000
19		5000	0	20000	40000	5000	0	5000	50000
20		3000	3000	0	2000000	40000	5000	0	20000
21		10000	1500	0	0	20000	0	5000	0
22		3000	0	0	150000	50000	1000	70000	20000
23		10000	0	7000	20000	35000	2000	10000	2000
24		5000	5000	3000	0	20000	5000	7000	2000
25		5000	5000	7000	0	30000	5000	3000	0
26		0	5000	0	0	35000	9000	5000	0
27		0	0	0	0	30000	0	0	0
28		2000	5000	0	0	30000	10000	0	0
29		0	0	0	0	20000	1000	10000	0
30		0	0	0	9000	30000	1500	10000	100000
31		0	1000	0	20000	30000	3000	7000	90000
32		5000	0	0	10000	30000	3000	0	30000
33		0	0	3000	10000	20000	2000	0	15000

## ANEXO 2

### FIGURAS

#### 1. Liofilizador marca LABCONCO. Freezone 4.5



**2. Ceba de *Streptococcus mutans* en Agar Mitis salivarius.**



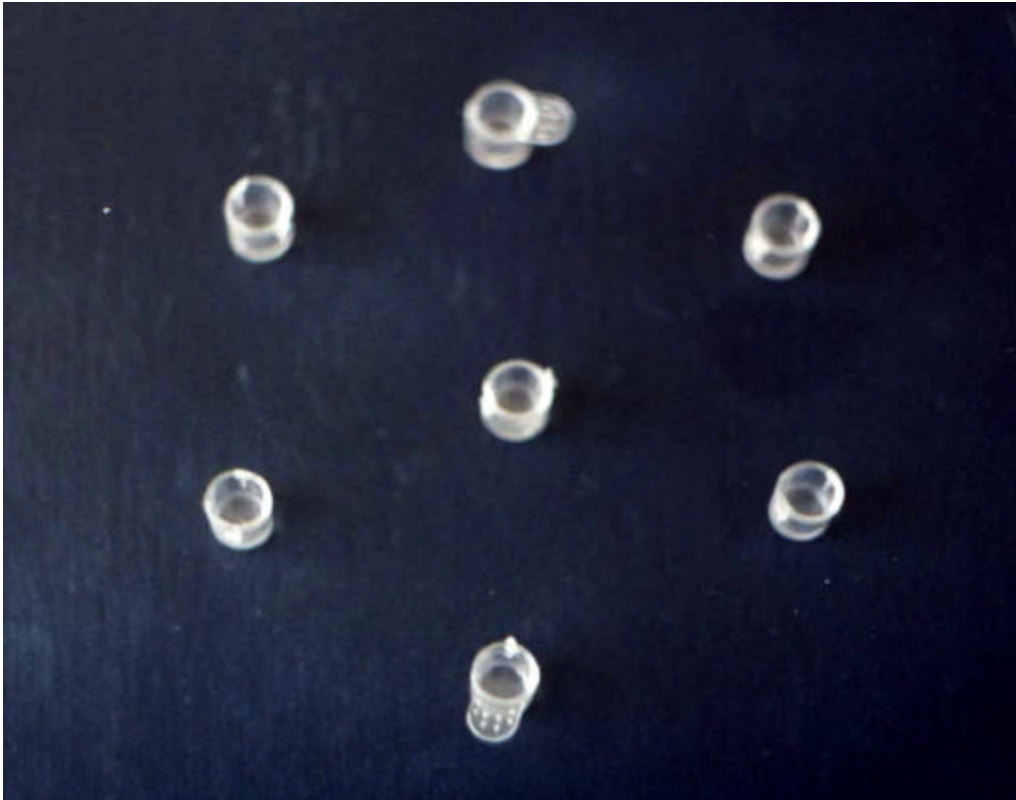
**3. Vial para la preservación de *Streptococcus mutans* en discos de gelatina**



**4. Tubo con micropocillos de Elisa para los discos de gelatina.**



**5. Micropocillos de Elisa con los discos de gelatina.**



**6. Viales con liofilizado de Leche descremada al 20%**



