



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE ODONTOLOGIA**

**Evaluación de especies de *Lactobacillus* como medio de protección natural contra *Streptococcus mutans***

**Trabajo de Titulación para optar al título de Odontólogo**

**Autor:**

**Cristian Ernesto Yandún Ramírez**

**Tutor:**

**Dr. Carlos Eduardo Espinoza Chávez**

**Riobamba, Ecuador, 2024**

## DERECHOS DE AUTORÍA

Yo, Cristian Ernesto Yandún Ramírez, con cédula de ciudadanía 1003131016, autor del trabajo de investigación titulado: Evaluación de especies *de Lactobacillus* como medio de protección natural contra *Streptococcus mutans*, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 24 de octubre de 2024



---

Cristian Ernesto Yandún Ramírez

C.I:103131016

## **ACTA FAVORABLE – INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

En la Ciudad de Riobamba, a los 5 días del mes de agosto de 2024, luego de haber revisado el Informe Final del Trabajo de Investigación presentado por el estudiante **CRISTIAN ERNESTO YANDÚN RAMÍREZ** con CC: 1003131016, de la carrera ODONTOLOGÍA y dando cumplimiento a los criterios metodológicos exigidos, se emite el **ACTA FAVORABLE DEL INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN** titulado “**EVALUACIÓN DE ESPECIES DE LACTOBACILLUS COMO MEDIO DE PROTECCIÓN NATURAL CONTRA STREPTOCOCCUS MUTAS**”, por lo tanto se autoriza la presentación del mismo para los trámites pertinentes.



Dr. Carlos Eduardo Espinoza Chávez  
**TUTOR**

## CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación Evaluación de especies de *Lactobacillus* como medio de protección natural contra *Streptococcus mutans* por Cristian Ernesto Yandún Ramírez con cédula de identidad número 1003131016, bajo la tutoría de Dr. Carlos Eduardo Espinosa Chávez; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 24 de octubre de 2024

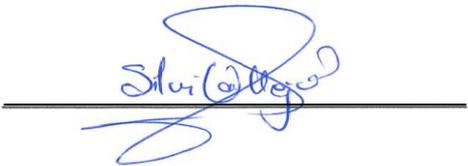
Presidente del Tribunal de Grado  
Dra. Tania Jackeline Murillo Pulgar



Miembro del Tribunal de Grado  
Ms. Silvia Alexandra Reinoso Ortiz



Miembro del Tribunal de Grado  
Dra. Silvia Verónica Vallejo Lara



# CERTIFICACIÓN

Que, **YANDÚN RAMÍREZ CRISTIAN ERNESTO** con CC: **1003131016**, estudiante de la Carrera **ODONTOLOGÍA**, Facultad de **CIENCIAS DE LA SALUD**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado “**EVALUACIÓN DE ESPECIES DE LACTOBACILLUS COMO MEDIO DE PROTECCIÓN NATURAL CONTRA STREPTOCOCCUS MUTAS**”, cumple con el 7 %, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **TURNITIN**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 3 de octubre de 2024



Dr. Carlos Eduardo Espinoza Chávez  
**TUTOR**

## **DEDICATORIA**

Dedico este logro profesional a mis padres Cecilia y Jorge quienes a pesar de las dificultades del día a día me han enseñado que, con el trabajo duro, la perseverancia y con el espíritu de lucha intacto se puede alcanzar cualquier objetivo por más imposible que parezca. Les estaré eternamente agradecidos queridos padres por guiarme durante el camino recorrido para poder culminar mi etapa como estudiante y poder convertirme en un profesional comprometido con la sociedad

A mi hermana Karla, la cual también ha adquirido el ejemplo de lucha heredado de nuestros padres y se encuentra forjando su propio camino como profesional y para quien he servido de inspiración durante mi formación académica.

A mis abuelos Jorge, Ana María, Mariana y Alfredo, quienes en vida me demostraron de lo que somos capaces los seres humanos para poder llegar al objetivo propuesto, a pesar del sin fin de adversidades a los cuales la vida nos pone a prueba. Hoy ya no están más aquí, sin embargo, su legado, enseñanzas y convicciones siempre estarán presentes conmigo y cada uno de los miembros de mi familia, un abrazo al cielo angelitos.

Y, por último, a mis tíos, primos, docentes y amigos cercanos, quienes aportaron de distintas maneras en este extenso viaje hacia la formación profesional.

Es inspirador y reconfortante recordar cada uno de los sacrificios que he realizado durante este largo y arduo camino hacia mi formación como profesional de la salud; todo mi esfuerzo y dedicación me han permitido llegar a este punto en el cual me encuentro realizando mi último trabajo formal como estudiante de pregrado, la satisfacción y el agradecimiento que siento es inefable y dedicado con mucho cariño a las personas antes mencionadas.

Cristian

## **AGRADECIMIENTO**

De mi la manera más considerada quiero hacer mi eterno agradecimiento a la que fue mi segunda casa, la Universidad Nacional de Chimborazo, por ayudarme con el permiso para hacer uso de su infraestructura, necesaria en el proceso de llevar a cabo mi proyecto de investigación.

Agradezco a mi docente tutor por haberme acompañado en este reto de realizar mi proyecto de investigación, por su paciencia, conocimiento y orientación, el cual es el último escalón previo a la obtención de mi título profesional.

Un sentido agradecimiento para todos aquellos docentes que impartieron su conocimiento, experiencia, valores morales y ética profesional durante mi formación a lo largo de estos 5 años. De la misma manera agradezco a todas las personas involucradas de una u otra forma durante la realización de este proyecto de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA

DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DE TRIBUNAL

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

CERTIFICADO ANTIPLAGIO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE GRAFICOS

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO I.....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Planteamiento del problema .....	17
1.2. Justificación.....	18
1.3. Objetivos.....	19
1.3.1. Objetivo general .....	19
1.3.2. Objetivos específicos.....	19
CAPÍTULO II.....	20
2. MARCO TEÓRICO .....	20
2.1. Placa Bacteriana .....	20
2.1.1. Estructura.....	21
2.1.2 Biosíntesis de biopelículas.....	22
2.2. Caries dental. ....	24

2.2.1. Etiología de la caries dental.....	24
2.3. Probióticos, prebióticos y simbióticos.....	26
2.3.1. Mecanismos de acción de probióticos.....	27
2.3.2. Vehículos de administración de probióticos.....	27
2.3.3. <i>Lactobacillus</i> como probióticos.....	28
2.4. Inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> por <i>Lactobacillus spp</i> .....	29
2.5. Pruebas de sensibilidad en microorganismos.....	30
2.6 Mecanismos de resistencia bacteriana.....	30
2.6.1. Resistencia natural.....	31
2.6.2. Resistencia adquirida.....	31
2.6.3. Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química.....	32
2.6.4. Alteración del sitio blanco.....	32
2.6.5. Alteración de las barreras de permeabilidad.....	32
2.6.6. Bombas de eflujo.....	33
CAPÍTULO III.....	34
3. METODOLOGÍA.....	34
3.1. Tipo.....	34
3.2. Diseño.....	34
3.3. Población y muestra.....	34
3.4. Criterios de selección.....	34
3.5. Entorno.....	34
3.6. Técnicas e instrumentos.....	34
3.7. Intervenciones.....	35
3.8. Análisis estadístico.....	42
3.9. Operacionalización de las variables.....	42

CAPÍTULO IV .....	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
4.1. Efecto inhibitorio de cepas de <i>Lactobacillus</i> frente a <i>S. mutans</i> mediante la técnica de difusión en agar .....	44
4.2. Diferencia de potencial inhibitorio entre <i>Lactobacillus delbrueckii</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> . .....	49
4.3. Potencial inhibitorio de las cepas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> .....	50
4.4. Pruebas de hipótesis .....	53
4.5. Discusión .....	56
CAPÍTULO V .....	58
5. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES .....	58
5.1. Conclusiones.....	58
5.2. Recomendaciones .....	58
BIBLIOGRAFÍA .....	60
ANEXOS .....	64
Anexo 1. Oficio dirigido al Mg. Luis Mera para obtener acceso a los laboratorios....	64
Anexo 2. Materia prima para la obtención de microorganismos.....	64
Anexo 3. Medios de cultivo.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estadísticos de la longitud de halo inhibitorio por cepa.....	49
<b>Tabla 2</b> Efecto inhibitorio (um) mediante técnicas de difusión en Agar .....	50
<b>Tabla 3</b> Medición del halo inhibitorio por cepa y Agar .....	51
<b>Tabla 4.</b> Prueba U de Man Whitney H1 .....	54
<b>Tabla 5.</b> Prueba U de Man Whitney H2 .....	54

## ÍNDICE DE GRAFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Efecto inhibitorio (um) mediante técnicas se Agar a las 24 horas .....	51
<b>Gráfico 2.</b> Efecto inhibitorio (um) mediante técnicas se Agar a las 48 horas .....	52
<b>Gráfico 3.</b> Comparación por tipo de lactobacillus .....	55

## INDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1.</b> Plaqueo del medio de cultivo en cajas Petri .....	36
<b>Fotografía 3.</b> Caldo de <i>Lactobacillus</i> spp.....	36
<b>Fotografía 4.</b> Siembra de <i>Lactobacillus</i> spp.....	37
<b>Fotografía 5.</b> Incubación de la muestra en anaerobiosis .....	37
<b>Fotografía 6.</b> Muestras fijadas en los portaobjetos.....	38
<b>Fotografía 7.</b> Proceso de tinción Gram.....	38
<b>Fotografía 8.</b> Preparación de medios.....	39
<b>Fotografía 9.</b> Caldo con <i>S. mutans</i> .....	40
<b>Fotografía 10.</b> Inoculación de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> y <i>Lactobacillus fermentum</i> en medios de cultivo.....	40
<b>Fotografía 11.</b> Preparación de discos de inhibición. ....	40
<b>Fotografía 12.</b> Muestras preparadas .....	41
<b>Fotografía 13.</b> Muestras en estufa de crecimiento .....	41
<b>Fotografía 14.</b> Estereomicroscopio a 60x.....	42
<b>Fotografía 15.</b> Diferenciación de cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.....	44
<b>Fotografía 16.</b> Muestra #1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....	45
<b>Fotografía 17.</b> Muestra #3 <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	45
<b>Fotografía 18.</b> Replica de <i>Streptococcus mutans</i> .....	45
<b>Fotografía 19.</b> Replica de <i>Lactobacillus</i> spp. ....	46
<b>Fotografía 20.</b> Muestras de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> transcurridas 24 horas.....	46
<b>Fotografía 21.</b> Muestras de <i>Lactobacillus fermentum</i> transcurridas 24 horas .....	47
<b>Fotografía 22.</b> Halos inhibitorios más representativos <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....	47
<b>Fotografía 23.</b> Halos inhibitorios más representativos <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	48
<b>Fotografía 24.</b> Halos inhibitorios más representativos <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....	48
<b>Fotografía 25.</b> Halos inhibitorios más representativos <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	48

## RESUMEN

La caries dental es la principal enfermedad dental y se desarrolla a partir de productos del metabolismo de los microorganismos propios de la flora bucal como el *Streptococcus mutans* conocida por ser la principal bacteria cariogénica. Sin embargo, ciertas especies como los *Lactobacillus* producen sustancias antibacterianas que ayudan al control de las especies cariogénicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial inhibitorio de dos especies de *Lactobacillus* seleccionadas y aisladas, contra el *Streptococcus mutans*. La presente investigación es de tipo experimental in vitro de corte transversal con un enfoque cuantitativo; para llevar a cabo la investigación se realizó la reactivación y diferenciación de las cepas, obteniendo 15 muestras idóneas a partir de las que se realizó ensayos de inhibición con discos de papel filtro (4 por muestra) impregnados con *S. mutans* que se evaluaron usando el sistema métrico micras(um) a las 24 y 48 horas con ayuda del estereomicroscopio. Como resultados se obtuvo que los *Lactobacillus delbruekii* y *Lactobacillus fermentum* mostraron capacidad inhibitoria siendo ligeramente superior el *L. delbruekii*. Se demostró la existencia de potencial inhibitorio por parte de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas sugiriendo que pudiesen ser empleados en tratamientos dentales preventivos a futuro.

**Palabras claves:** *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus fermentum*, inhibición, *Streptococcus mutans*, bacteriocina

## ABSTRACT

Dental caries is the main dental disease and it develops from products of metabolism of microorganisms of the oral flora such as *Streptococcus mutans*, known for being the main cariogenic bacteria. However, certain species such as *Lactobacillus* produce antibacterial substances that help control cariogenic species. The objective of this work was to evaluate the inhibitory potential of two selected and isolated *Lactobacillus* species against *Streptococcus mutans*. The present research is of an experimental in vitro cross-sectional type with a quantitative approach; to carry out the research, the reactivation and differentiation of the strains was carried out, obtaining 15 suitable samples from which inhibition tests were carried out with filter paper discs (4 per sample) impregnated with *S. mutans* that were evaluated using the micron (um) metric system at 24 and 48 hours with the help of a stereomicroscope. The results showed that *Lactobacillus delbruekii* and *Lactobacillus fermentum* showed inhibitory capacity, with *L. delbruekii* being slightly superior. The existence of inhibitory potential by the selected *Lactobacillus* strains was demonstrated, suggesting that they could be used in preventive dental treatments in the future.

**Keywords:** *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus fermentum*, inhibition, *Streptococcus mutans*, bacteriocin

Reviewed by

ADRIANA  
XIMENA  
CUNDAR RUANO

Firmado digitalmente  
por ADRIANA XIMENA  
CUNDAR RUANO  
Fecha: 2024.10.23  
23:51:56 -05'00'

MsC. Adriana Ximena Cundar Ruano, Ph.D.

**ENGLISH PROFESSOR**

C.C. 1709268534

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa multifactorial que afecta a una gran parte de la población mundial. Entre los patógenos responsables que se destacan se encuentran el *Streptococcus mutans*, una prioridad en la odontología preventiva. En este contexto, los probióticos han emergido como una alternativa prometedora para la prevención y tratamiento de infecciones bucales, mismos que son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped. Entre ellos, las especies de *Lactobacillus* han captado un considerable interés debido a sus propiedades beneficiosas. Estos microorganismos tienen la capacidad de producir ácido láctico y otras sustancias antimicrobianas, competir por nutrientes y espacio, y modular el sistema inmunológico<sup>(1)</sup>.

En el campo de la microbiología y la salud oral, el equilibrio del microbiota bucal es crucial para prevenir diversas enfermedades, entre ellas la caries dental, una de las patologías más comunes en la población mundial. *Streptococcus mutans*, una bacteria grampositiva, es conocida por su papel predominante en la formación de caries dental debido a su capacidad para metabolizar azúcares y producir ácidos que desmineralizan el esmalte dental. La búsqueda de métodos efectivos y naturales para contrarrestar la acción de *S. mutans* ha llevado a los investigadores a explorar el uso de probióticos, en particular especies de *Lactobacillus*<sup>(2)</sup>.

Diversas investigaciones han demostrado que ciertas especies de *Lactobacillus* pueden inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* y reducir la formación de biofilms, sugiriendo su potencial como agentes protectores naturales contra la caries dental. Los mecanismos por los cuales *Lactobacillus* ejercen esta acción protectora son variados e incluyen la producción de bacteriocinas, compuestos antimicrobianos que pueden inhibir específicamente a *S. mutans*, y la competencia por adhesión a las superficies dentales, impidiendo que el patógeno se establezca y forme biofilms. Además, los estudios clínicos han comenzado a explorar la eficacia de los *Lactobacillus* en la prevención de la caries dental en diferentes grupos de población, se ha evaluado el uso de productos lácteos fermentados, suplementos probióticos y enjuagues bucales que contienen *Lactobacillus*, mostrando resultados prometedores en la reducción de la incidencia de caries y la disminución de los niveles de *S. mutans* en la cavidad oral. Estos hallazgos no solo destacan la efectividad de

*Lactobacillus*, sino que también subrayan su seguridad y viabilidad como una estrategia de intervención natural y no invasiva<sup>(3)</sup>.

El presente trabajo revisará el papel de las especies de *Lactobacillus* como medio de protección biológica natural contra *Streptococcus mutans*, analizando los mecanismos de acción involucrados, los resultados de estudios experimentales y clínicos, así como las posibles aplicaciones y limitaciones en el ámbito de la salud dental.

El uso de especies de *Lactobacillus* como medio de protección biológico natural contra *Streptococcus mutans* representa una estrategia innovadora y ecológica en la lucha contra la caries dental. A través de diversos mecanismos de acción, estas bacterias probióticas pueden inhibir el crecimiento de patógenos bucales y promover un equilibrio saludable del microbiota oral.

Continuar con la investigación en este campo no solo permitirá comprender mejor las interacciones microbianas en la cavidad oral, sino que también facilitará el desarrollo de nuevas terapias probióticas que contribuyan a la salud dental y general de la población.

### **1.1. Planteamiento del problema**

La caries dental es una enfermedad que según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) refleja que entre un 60% a 90% de los niños y el 100% de los adultos la presentan en donde el principal microorganismo responsable de la generación de caries dental es el *Streptococcus mutans*<sup>(1)</sup>.

La caries está relacionada con la prevalencia de *Streptococcus mutans* en saliva. Esta bacteria Gram positiva metaboliza los carbohidratos consumidos durante la dieta para producir ácidos que desmineralizan el esmalte del diente, causando porosidades en donde proliferan y con el tiempo se convierten en cavidades que dejan expuesta la dentina al medio bucal. Por estas razones este género de bacteria se le ha designado el título de la principal bacteria causante de caries y su presencia en la cavidad bucal forma parte de los principales factores de riesgo en la etiología de la caries dental<sup>(4)</sup>.

Actualmente los métodos de higiene sumado al trabajo de los odontólogos evitan que esta bacteria pueda proliferar y adherirse a las superficies del diente, sin embargo, las personas no suelen cuidar sus piezas dentales y terminan generando caries o por el contrario no siempre las personas tienen acceso a dichos métodos, o a citas odontológicas para cuidar su salud oral, esto se ve reflejado en un aumento de la prevalencia de la caries dental<sup>(4)</sup>.

## 1.2. Justificación

El desarrollo de la presente investigación cuyo tema es “Evaluación de especies de *Lactobacillus* como medio de protección biológico natural contra *Streptococcus mutans*” es un tema de gran importancia debido a que actualmente existen casos de personas en donde se ha observado la disminución de caries dental. En dichos pacientes está presente el *Lactobacillus* los cuales se menciona que son útiles para la prevención de caries dental inhibiendo el crecimiento bacteriano del *S. mutans* haciendo uso de bacteriocinas lo cual genera un efecto antagónico sobre la bacteria cariogénica.

El gran interés e importancia de desarrollar el estudio recalca en determinar el nivel de inhibición de *S. mutans* que generan los *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus fermentum* siendo estos microorganismos parte de la flora bacteriana presente en la cavidad bucal para posteriormente poder establecer una relación entre la disminución de la caries dental y el efecto inhibitorio de los *Lactobacillus*.

Lo que se pretende obtener es información útil para ser compartida, publicada y que se encuentre al alcance de odontólogos y científicos, todo esto mediante un estudio in vitro en el cual se tendrá un seguimiento constante de las cepas. El objetivo principal es recolectar información verídica que demuestre la capacidad inhibitoria de los *Lactobacillus* mencionados, así como también se espera obtener información sustentable, valida y verificada con conclusiones adecuadas al tema mediante el estudio de análisis de gran nivel investigativo para desarrollar buenas bases teóricas y que sean apoyo para la realización de estrategias. Se logrará contestar a todas las preguntas, dudas e interrogantes, ofrecer información precisa y justificada para conseguir satisfacer con las expectativas teóricas en la población en general y profesionales de ciencias de la salud y de personas que desearan emplear este estudio investigativo en posibles futuros proyectos como fuente sobre todo en aquellos que tengan como finalidad incluir el uso de probióticos que contengan estas especies de *Lactobacillus*, como un método eficaz para la prevención de la caries dental

Es viable la realización de este trabajo de investigación ya que el investigador o en este asunto el alumno tiene el conocimiento, respaldo científico necesario y el apoyo del docente tutor respectivo quien conoce y domina el presente tema tratado en esta investigación; de la misma manera se puede realizar desde el lugar de perspectiva sustentable económico ya que los gastos necesarios pueden ser cubiertos, se tienen todos los medios necesarios y con conveniente lapso de tiempo para la elaboración de la indagación correcta.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar in vitro el efecto de especies de *Lactobacillus* frente a cepas de *Streptococcus mutans*.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Demostrar el efecto inhibitorio de cepas de *Lactobacillus* frente a *S. mutans* mediante la técnica de difusión en agar
- Determinar la diferencia de potencial inhibitorio entre *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum* sobre *Streptococcus mutans*
- Identificar el potencial inhibitorio de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum* sobre *Streptococcus mutans*

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Placa Bacteriana

En la historia del biofilm, el científico Anton van Leeuwenhoek en el año de 1684 fue la primera persona en observarlo usando muestras del biofilm extraídas de sus propios dientes. Tiempo después, en el año de 1864 el científico Louis Pasteur observó que los barriles de vino sufrían una biotransformación en ácido acético y determinó que los responsables de este cambio eran las bacterias que crecían en las paredes de los barriles de vino. Culminando la década de los años 80, el término "biopelículas" solo se había utilizado en microbiología ambiental porque se había observado su formación en tubos de agua potable y en la parte inferior de los barcos principalmente. El término biopelículas era completamente ajeno a la microbiología médica hasta 1985, cuando el Dr. Jhon Costerton, quien es considerado como el padre de la biopelículaología, propuso que los microorganismos que crecían en forma de biopelículas podrían causar muchas infecciones crónicas<sup>(5)</sup>.

La placa bacteriana es un conjunto de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos que se encuentran en la boca y se adhieren a los dientes u otras superficies duras, creando una película. Solo algunas bacterias, como el *\*Streptococcus mutans\**, tienen la capacidad de adherirse tanto a los dientes como a la mucosa. Estas bacterias poseen receptores especiales que les permiten unirse entre sí, formando lo que se conoce como dextrano.<sup>(6)</sup>

La placa bacteriana tiende a acumularse en áreas de los dientes donde el cepillado o la acción natural de los músculos bucales no alcanza, como en las fisuras, surcos, espacios entre los dientes y alrededor de empastes defectuosos. Esto puede llevar a una inflamación e infección constante en las encías y tejidos cercanos, lo que deriva en enfermedades periodontales como la gingivitis y la periodontitis. Actualmente, la distribución y gravedad de las enfermedades bucales varían según la región, estando estrechamente ligadas a factores socioculturales, económicos, ambientales y de comportamiento. Diversos estudios socioepidemiológicos subrayan la influencia de estos factores en la salud bucal. Además de las condiciones de vida inadecuadas, los principales riesgos están relacionados con hábitos de vida poco saludables, como una mala alimentación, deficiente higiene dental y el limitado acceso a servicios de salud bucal.<sup>(7)</sup>

En el análisis clínico, la placa dentobacteriana no es visible a simple vista, aunque esto cambia si hay una cantidad considerable o si se utilizan técnicas como los reveladores de placa, los cuales tiñen la placa presente en los dientes, encías y lengua. Estos reveladores se emplean como una herramienta para motivar a los pacientes a eliminar la placa de manera mecánica mediante el cepillado. La placa es más notoria en las superficies proximales y linguales, así como en las áreas molares, y se observa menos en la parte anterior de los dientes. El biofilm en las superficies proximales se diferencia de las áreas donde el esmalte se forma, como en fosas y fisuras. Por tanto, la composición del biofilm en los dientes está determinada no solo por la ubicación del diente en la boca, sino también por la anatomía y fisiología de la superficie dental.<sup>(8)</sup>

Es importante considerar que la microflora oral enfrenta constantemente desafíos para sobrevivir en el ambiente acidogénico de la boca, debido a factores como el pH, las fluctuaciones de temperatura y la composición química de los alimentos. Con el paso del tiempo, la placa dental se organiza en una estructura compleja, donde los microorganismos ocupan posiciones específicas, determinadas por las características físicas y biológicas del entorno. Este proceso da lugar a un mosaico de microorganismos que interactúan de manera efectiva, ya que son capaces de adaptarse y encontrar áreas favorables para adherirse, como las superficies dentales, el surco gingival, la lengua, las amígdalas y las membranas mucosas que recubren la boca.

La placa bacteriana mantiene un pH neutro o ligeramente ácido, pero este disminuye en contacto con los azúcares, para luego recuperarse entre 30 y 60 minutos después. Cabe destacar que algunas personas tienen menor susceptibilidad a desarrollar caries, ya que su pH de reposo varía entre 6.5 y 7<sup>(8)(9)</sup>.

La biopelícula está compuesta por una variedad de microorganismos, donde las bacterias que residen en la placa bacteriana son el principal factor que contribuye al desarrollo de problemas como la caries dental y las enfermedades periodontales. Estas bacterias presentes en la placa deben poseer dos características esenciales: ser capaces de producir ácidos (acidógenas) y resistir condiciones ácidas (acidúricas)<sup>(8)</sup>.

### **2.1.1. Estructura**

La placa dental o también denominado biofilm se puede subdividir en grupos los cuales tendrán variaciones en su estructura, ya que dichos grupos se localizan en diferentes zonas de la superficie dental. Las características únicas de cada tipo de placa bacteriana se deben

a sus variaciones microbiológicas y bioquímicas de la zona en donde se encuentren, sin embargo, cabe mencionar que la placa supragingival es la que se encuentra con más frecuencia y que otros tipos de placa como la radicular se observara en aquellos casos cuando existe una patología previa que causa unan reabsorción ósea y por ende una retracción gingival lo que expone las raíces al medio bucal<sup>(10)</sup>.

La placa supragingival se sitúa principalmente en el margen gingival y en su composición se observa un 80 % de agua y un 20 % de fase sólida. Esta fase sólida está formada en su mayoría por bacterias (70%) y por una matriz orgánica o acelular. En general en su estructura posee bacterias diversas y células descamadas, dentro de un matriz de mucoproteínas y mucopolisacáridos; siendo así una zooglea formada por una serie de microorganismos aglutinados por una sustancia microbiana que los une y los adhiere a la superficie del diente<sup>(9)</sup>.

Por otra parte, la placa subgingival que es aquella que se ubica por debajo del surco gingival lleva a cabo su desarrollo en condiciones más selectivas como un pH mas alcalino o potencial de oxidorreducción bajo. Dichas condiciones se deben a que en la zona del margen gingival considerado como el “espacio biológico” el cual contiene liquido crevicular, plasma, inmunoglobulinas, quienes van a influir en el tipo de microorganismos que se acentúen ahí, siendo los microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos quienes predominarán esta zona causando o no variaciones en la salud periodontal del paciente. En casos de gingivitis o periodontitis podríamos encontrar bacterias como *Actinomyces spp.*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Prevotella*<sup>(10)(11)</sup>.

Por último, la formación de la placa radicular, se forma únicamente cuando la persona ha sufrido previamente de enfermedad periodontal en la cual como resultado hubo una lisis del hueso y posteriormente una retracción gingival de la encía hacia apical. En este caso la placa bacteriana se conformará de microorganismos como *Streptococcus sanguis*, *Actynomices*<sup>(10)(11)</sup>.

### **2.1.2 Biosíntesis de biopelículas**

El proceso de formación de las biopelículas y su proceso de crecimiento se da en un estado de suspensión, en el cual las bacterias permanecen adheridas a las superficies del diente dando como resultado una alteración fenotípica de la estructura bacteriana. Al iniciar este proceso de formación las bacterias sésiles se encontrarán en yuxtaposición con las células bacterianas de la misma especie y de otras especies dando origen así a lo que se denomina

como microcolonia. Estas formaciones van a contener gran cantidad de bacterias correspondientes al microambiente que se formará en cada biopelícula, el cual dependerá de la producción de matriz de exopolisacáridos y de la yuxtaposición de las bacterias. La cooperación fisiológica de estas bacterias dará como resultado comunidades microbianas maduras muy eficientes<sup>(12)</sup>.

Se puede decir que el proceso de formación de la biopelícula se conforma de cuatro fases complejas y dinámicas conocidas como: adhesión, agregación, maduración y disgregación, que se llevan a cabo mediante fuerzas y mecanismos que regulan el actuar de la matriz extracelular<sup>(5)</sup>.

La primera fase es la adhesión en donde los microorganismos se depositan sobre la superficie del diente dando comienzo a la formación de la biopelícula, durante esta etapa se da a lugar dos fenómenos conocidos como atracción y adhesión, siendo el primero definido como un proceso reversible en donde las bacterias mediante las fuerzas de Van der Waals son depositados en las superficies lisas de los dientes. Los microorganismos al ser atraídas al diente mediante estas fuerzas dan inicio al proceso de adhesión el cual ya será irreversible, este proceso lo realizan las bacterias mediante moléculas constitutivas como : *pili*, flagelos, ácidos teicoicos y moléculas que los microorganismos expresan bajo circunstancias de estrés; denominándose como componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas de matriz adhesiva (CMSMMA)<sup>(13)</sup>.

Siguiendo con la fase de agregación, esta da inicio cuando múltiples bacterias se adhieren a las que ya se encuentran en las superficies de los dientes, dando como resultado procesos en los cuales se liberan gran cantidad de metabolitos secundarios que son útiles para la comunicación bacteriana, denominados como *quorum sensing* (QS). “Se trata de un sistema mediante el cual las bacterias inducen o reprimen la expresión de genes que codifican factores de virulencia.”<sup>(13)</sup>.

Posteriormente se da la fase de maduración (3ra fase) en donde las colonias de bacterias agregadas comienzan a multiplicarse, segregando exopolisacáridos (EPS), proteínas y liberación de ácido desoxirribonucleico extracelular (ADN) que darán origen a la matriz extracelular y posterior desarrollo de la biopelícula. De manera específica el ADN proporciona rigidez, al mismo tiempo que ayuda con la transmisión de genes de resistencia en la colonia de microorganismos; además se forman canales de agua a través y alrededor de la biopelícula en por donde pasaran las moléculas de QS y permitirán que el biomedio en

el cual se encuentran los microorganismos adquieran nutrientes, al igual que se eliminaran productos del metabolismo bacteriano<sup>(5)(14)</sup>.

Luego de los cambios morfológicos y metabólicos correspondientes a la fase anterior, se produce la disgregación, la cual es la última fase del ciclo de la biosíntesis del biofilm, ocurre cuando la cantidad de unidades formadoras de colonias de las bacterias aumenta de manera exponencial y las bacterias de dicho biofilm comienzan a producir metabolitos que ya no podrán ser excretados a través de los canales de agua que rodean al mismo. Estos productos del metabolismo bacteriano estimulan el QS, el mismo que posteriormente induce la expresión de genes que codifican enzimas que poseen actividad DNA-asa, proteasa y fosfodiesterasa y moléculas surfactantes, las cuales son capaces de degradar la matriz extracelular<sup>(14)</sup>. Este efecto se ve potenciado por otros productos del metabolismo bacteriano que se mencionan en el siguiente fragmento:

*“Además de las moléculas que degradan la matriz extracelular de las biopelículas, existen otras moléculas que también disgregan biopelículas; por ejemplo, el óxido nítrico (NO), causa la disgregación de biopelículas formadas por P. aeruginosa debido a que disminuye la concentración intracelular de un segundo mensajero, denominado di-GMP cíclico, haciéndolos cambiar de una vida en estado libre a biopelículas, o viceversa”<sup>(5)(14)</sup>.*

## **2.2. Caries dental.**

La caries dental es una de las principales enfermedades orales que afecta a gran parte de la población; es una enfermedad de origen multifactorial que puede iniciar desde edades tempranas cuando comienza el ciclo normal de la erupción dentaria, lo que puede generar consecuencias locales hasta consecuencias que pueden llegar a afectar el estilo de vida de la persona<sup>(15)</sup>.

Actualmente una caries dental se considera como un proceso en el cual se deteriora la estructura dentaria de manera progresiva, en la cual su desarrollo se empieza mucho antes de que la pieza dental comience a mostrar signos clínicos visibles como cavitaciones u orificios. Los microorganismos que colonizan las superficies libres de las piezas dentales producen ácidos que causan la desmineralización de la parte mineral y la disgregación de la parte orgánica<sup>(15)</sup>.

### **2.2.1. Etiología de la caries dental**

La caries dental al igual que cualquier otra enfermedad que es de origen multifactorial, su incidencia se basa en varios factores, de manera específica los denominados factores básicos primarios o principales: dieta, huésped y microorganismo, en donde su interacción es

indispensable para lograr superar los mecanismos de defensa del esmalte y posteriormente se produzca la enfermedad. En general la caries dental no depende de manera exclusiva de los factores etiológicos primarios sino que la aparición y desarrollo de la enfermedad dependerá adicionalmente de otros factores concurrentes denominados factores etiológicos moduladores: tiempo, edad, salud general, fluoruros, grado de instrucción, nivel socioeconómico, experiencia pasada de caries, grupo epidemiológico, y variables de comportamiento, los cuales contribuyen e influyen decisivamente en el surgimiento y evolución de lesiones cariosas<sup>(16)</sup>.

Dentro de los factores etiológicos primarios los microorganismos tienen un papel esencial en la aparición de esta enfermedad, siendo identificadas como las principales bacterias cariogénicas el *Lactobacillus* y los *Streptococcus mutans*. Al ser la caries dental una enfermedad ocasionada por bacterias se estableció una noción básica en la cual se menciona que la caries es una enfermedad similar a cualquier otra patología infecciosa y por ende entra dentro de lo que se denomina como un balance existente entre la respuesta inmune del hospedero y la patogénesis microbiana. De manera general se conoce que la respuesta inmune desencadenada por el cuerpo ante un agente extraño, suele ser suficiente para neutralizar al antígeno y de la misma manera sería capaz de controlar a la microflora bacteriana normal en caso de necesitarlo<sup>(16)(17)</sup>.

La cavidad bucal humana posee una gran variedad y cantidad de poblaciones microbianas de todo el cuerpo, estimándose que aquí cohabitan gran variedad de cepas de microorganismos. Los microorganismos presentes en la cavidad que tienen mayor relación con la caries son *Streptococcus*, con las subespecies *S. mutans*, *S. sobrinus*, y *S. sanguis*; *Lactobacillus*, con las subespecies *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarium* y *L. oris* y los *Actinomyces*, con las subespecies, *A. israelis* y *A. naslundii*<sup>(16)(17)</sup>.

La dieta es otro factor importante dentro de la etiología de la caries dental debido a que gran cantidad de los alimentos que se consumen en la dieta diaria contienen los nutrientes que son necesarios para que las bacterias puedan realizar su metabolismo. Los principales son aquellos alimentos que tienen carbohidratos fermentables, especialmente los que contienen sacarosa, la cual genera un mayor efecto cariogénico luego de su fermentación. Adicionalmente ayuda a la colonización de microorganismos orales lo que permite que se fije de una mejor manera al diente<sup>(18)</sup>.

El aspecto importante de la dieta es que, los microorganismos usan los carbohidratos fermentables en su metabolismo dando como resultados ácidos que intervienen en el inicio

de la desmineralización de los tejidos dentales duros; es así como se produce una caída de pH en el medio oral lo que favorece a un medio para el crecimiento de otras bacterias cariogénicas. Además existen otros factores individuales que afectan la variación del pH, como: cantidad y composición del biofilm dental, flujo salival, capacidad buffer y tiempo de eliminación de sustancia, los cuales causan una caída brusca del pH por debajo del nivel crítico se consideran acidógenas y potencialmente cariogénica<sup>(18)</sup>.

### **2.3. Probióticos, prebióticos y simbióticos**

Los probióticos son suplementos alimenticios compuestos por microorganismos vivos que, al ser consumidos, benefician al huésped al equilibrar su microbiota intestinal. Estos microorganismos se administran en cantidades adecuadas para mejorar la salud de quien los consume. Los probióticos ejercen efectos positivos sobre la microbiota intestinal humana, como la inhibición de patógenos y la mejora de la respuesta inmune, lo que fortalece las defensas naturales del cuerpo. Su uso promueve la proliferación de bacterias benéficas, mientras que reduce la de bacterias potencialmente perjudiciales.<sup>(19)</sup>

Por otro lado, los prebióticos son compuestos alimenticios que no se digieren, pero que estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon, ayudando también a inhibir patógenos en el intestino grueso. Además, los simbióticos son productos que combinan probióticos y prebióticos con el fin de beneficiar diferentes partes del tracto gastrointestinal, tanto en el intestino delgado como en el grueso.<sup>(19)</sup>

La mayoría de los probióticos provienen de bacterias conocidas como bacterias del ácido láctico (BAL), que han sido utilizadas en la industria alimentaria durante siglos para la producción de alimentos fermentados y la mejora de sus características organolépticas. Estas bacterias son cocos o bacilos Gram positivos, no esporuladas y usualmente no móviles. Según los productos que generan durante la fermentación de los carbohidratos, las BAL se dividen en dos grupos: el homofermentativo, que produce principalmente ácido láctico (incluyendo géneros como *Lactococcus*, *Streptococcus* y la mayoría de *Lactobacillus*), y el heterofermentativo, que además del ácido láctico produce acetato, etanol y dióxido de carbono (como los géneros *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus*). Aunque las bifidobacterias no pertenecen a las BAL, también se emplean comúnmente como probióticos. En particular, los lactobacilos son ideales para usarse como probióticos en la cavidad bucal debido a su baja implicación en infecciones humanas y su capacidad para producir sustancias antimicrobianas, como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas. Son componentes clave del

biofilm oral humano y su consumo es seguro. Estudios científicos han demostrado que los lactobacilos pueden reducir el mal aliento causado por compuestos de azufre volátiles y prevenir enfermedades como caries, periodontitis y candidiasis en la boca.<sup>(20)(21)</sup>

### **2.3.1. Mecanismos de acción de probióticos**

Los probióticos y prebióticos comparten mecanismos de acción similares al influir en la microbiota endógena, aunque se diferencian en su composición y metabolismo. En el caso de los probióticos, se reconocen tres principales mecanismos de acción: primero, inhiben la adhesión de bacterias patógenas a la mucosa salival bloqueando los sitios de unión o creando una barrera física. Segundo, compiten con los patógenos por los nutrientes en la cavidad bucal. Tercero, generan sustancias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, que reducen la cantidad de patógenos al alterar su metabolismo o inhibir la producción de toxinas. Además, los probióticos regulan el sistema inmunológico en la mucosa bucal e intestinal al equilibrar citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, lo que ayuda a mantener una "inflamación controlada" para prevenir la invasión de patógenos que causan enfermedades.<sup>(20)(21)</sup>

### **2.3.2. Vehículos de administración de probióticos**

Existe una amplia gama de productos en el mercado para el transporte de bacterias probióticas, entre los cuales se incluyen pastillas, cápsulas, chicles, gotas y productos específicos, estos últimos son los más populares entre los niños. Dichos productos contienen fosfopéptidos de caseína (CPP), que inhiben la desmineralización y fomentan la remineralización del esmalte dental<sup>(20)</sup>.

Por ejemplo, la línea ProBiora Health™ ofrece tabletas orales que contienen una combinación de tres cepas de \*Streptococcus\* (S. oralis KJ3®, S. uberis KJ2® y S. rattus JH145®) diseñadas para mejorar la salud bucal tanto en humanos como en mascotas. Por otro lado, Oral Complete se presenta en cápsulas que incluyen FOS, complejo manano-oligosacárido y seis cepas probióticas, entre ellas \*Lactobacillus acidophilus\*, \*Bifidobacterium subtilis\* (DE111™) y \*L. rhamnosus\*, formuladas para tratar el mal aliento, las enfermedades de las encías y los cálculos en las amígdalas<sup>(20)(22)</sup>.

Asimismo, los productos Oral Health Probiotics consisten en tabletas masticables que contienen 12 cepas probióticas, incluyendo \*S. salivarius\* K12 y \*L. rhamnosus GG\*, las cuales protegen dientes, encías y favorecen la salud del tracto respiratorio superior. En cuanto a la marca BioGaia Prodentis, ofrecen comprimidos, chicles y gotas que contienen

\**Lactobacillus reuteri* Prodentis\* (DSM 17938 y ATCC PTA 5289), disuelto en aceites de girasol y palmiste, los cuales poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, beneficiando la salud bucal<sup>(22)</sup>.

Este tipo de complemento se aplica mediante una cureta o jeringa no invasiva para distribuir el aceite en las bolsas dentales. En el caso de las tabletas, la combinación de \**L. reuteri*\* con aceites de palma hidrogenado y de menta, junto con sucralosa, ayuda a mantener la mineralización dental.<sup>(22)</sup>

### **2.3.3. *Lactobacillus* como probióticos**

Las especies de *Lactobacillus* son bacterias facultativas grampositivas, no formadoras de esporas y con forma de bastón que fermentan los carbohidratos hasta convertirlos en ácido láctico como criterio de valoración principal. Estas bacterias son taxonómicamente complejas y a menudo requieren identificación molecular para la especiación. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y tienen múltiples usos comerciales, especialmente en la fermentación de queso y otros productos lácteos. Muchos lactobacilos son flora comensal que se encuentra en el tracto gastrointestinal humano y en el tracto genitourinario femenino. Son beneficiosos para ayudar a proteger contra enfermedades crónicas como la enfermedad inflamatoria intestinal y son un miembro importante del microbioma intestinal y vaginal. Además, dado que la mayoría de las especies de *Lactobacillus* son microorganismos probióticos, producen enzimas que muestran propiedades antibióticas, anticancerígenas e inmunosupresoras. Sin embargo, en algunos casos, los lactobacilos pueden actuar como patógenos oportunistas causando bacteriemia por *Lactobacillus* (LB), endocarditis, abscesos hepáticos y dentales e infecciones de prótesis de rodilla. En ocasiones, la fuente de estas infecciones se ha atribuido al uso de probióticos que contienen *Lactobacillus*. Los probióticos se utilizan comúnmente para la prevención de infecciones como *Clostridium difficile* o la prevención de la diarrea asociada a antibióticos, entre otras enfermedades. Aunque los probióticos generalmente se reconocen como seguros y la mayoría tienen excelentes perfiles de seguridad, han surgido preocupaciones sobre su seguridad debido a los casos reportados<sup>(23)</sup>.

Se ha comprobado que algunas bacterias productoras de ácido láctico pueden generar una respuesta inmune secretora específica, mientras que otras intensifican la reacción inflamatoria del sistema inmune intestinal. Al administrarse de forma oral bacterias como *L. casei*, *L. delbrueckii* spp., *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*, se observa un aumento de

células B y de inmunoglobulina A (IgA), además de inducir la interacción de la IgA con las células M de las placas de Peyer. En algunos casos, también se estimula la producción de células IgM<sup>+</sup>(<sup>24</sup>).

Asimismo, se ha detectado un incremento de linfocitos CD4, lo que sugiere una mayor interacción con las placas de Peyer y un aumento en la migración de células T y B. Este aumento de IgA secretora en los primeros meses de vida es particularmente relevante, ya que durante esta etapa los niveles de IgA son bajos y no hay anticuerpos específicos contra la mayoría de virus y bacterias, aunque el cuerpo ya tiene la capacidad para producirlos(<sup>24</sup>).

#### **2.4. Inhibición de *Streptococcus mutans* por *Lactobacillus spp***

En presencia de azúcar, especialmente sacarosa, produce glucanos insolubles en agua que se acumulan en las superficies de los dientes como placa dental o biopelícula oral que proporciona una base para el desarrollo de comunidades polimicrobianas. Estas biopelículas no tratadas pueden provocar enfermedades bucales(<sup>25</sup>).

*Streptococcus mutans* posee la enzima glucosiltransferasas codificada por GtfB, -C y -D; estas enzimas son responsables de producir polímero de glucano unido a (1-3) o (1-6), que son responsables de la formación de placa dental. La comunicación célula a célula, ya sea inter o intra especies, es necesaria para el desarrollo de la placa dental madura que contiene comunidades polimicrobianas. *S. mutans* también posee una vía de señalización mediada por LuxS que afecta la formación de biopelículas, maduración y producción de bacteriocina(<sup>25</sup>). Existe evidencia científica que sugiere que el género *Lactobacillus* desempeña un papel protector mediante la producción de diferentes tipos de bacteriocinas, proteínas con propiedades antibacterianas que actúan a través de diversos mecanismos. De manera similar, especies del género *Streptococcus*, como *Streptococcus dentisani*, han mostrado potencial como una nueva opción terapéutica para tratar la caries dental. Además, se ha observado que los probióticos presentan propiedades antagónicas contra diversas especies bacterianas mediante la producción de bacteriocinas, lo que favorece la exclusión competitiva en el nicho ecológico al impedir la adhesión de patógenos. Se sabe que *Lactobacillus spp.* forma parte de la microbiota oral y tiene una gran capacidad de adhesión, lo que, junto con la producción de bacteriocinas, puede reducir la presencia de *Streptococcus mutans* en las superficies dentales cubiertas de saliva(<sup>22</sup>).

Una de las especies más destacadas por su capacidad de producir sustancias antagónicas es *Lactobacillus paracasei*, que inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans*, bacterias periodontopáticas e incluso hongos. Alrededor de 10 especies de *Lactobacillus* están

presentes en lesiones cariosas, cohabitando con otras especies como *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei/paracasei* y *Lactobacillus salivarius*, que suelen encontrarse en estado planctónico<sup>(1)(22)</sup>.

## **2.5. Pruebas de sensibilidad en microorganismos**

Las técnicas de dilución en caldo o agar son esenciales para evaluar de manera cuantitativa la efectividad de los antimicrobianos frente a cultivos bacterianos. Se elabora una serie de tubos o placas con diferentes concentraciones del antibiótico, que luego se inoculan con una suspensión estandarizada del microorganismo. Tras una incubación durante la noche, se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano. Los antibiogramas son fundamentales para analizar la sensibilidad de los microorganismos a los fármacos antimicrobianos, ya que proporcionan información crucial para seleccionar tratamientos en casos de infección. Es vital que estas pruebas estén estandarizadas, ya que la reproducibilidad de los resultados es esencial para su validez clínica<sup>(26)(27)</sup>.

La creciente resistencia a los antimicrobianos resalta la importancia de realizar pruebas de susceptibilidad, incluso en aquellos casos en que se asume que los microorganismos son sensibles. Cada laboratorio debe adaptar sus métodos y políticas de tratamiento según su contexto específico y la prevalencia de resistencias en su área. Por último, es importante señalar que no existe un método único que reproduzca todas las condiciones bajo las cuales un microorganismo causa infección, lo que complica el desarrollo de pruebas estandarizadas y precisas. La capacidad de los laboratorios para llevar a cabo pruebas fiables se vuelve crucial en el manejo de infecciones a medida que la resistencia antimicrobiana sigue siendo un desafío importante.<sup>(26)(28)</sup>.

## **2.6 Mecanismos de resistencia bacteriana**

La resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. La creación de nuevos fármacos antibacterianos, junto con su uso irresponsable y la presión evolutiva generada por su empleo, ha impulsado el surgimiento de entre 4 y 6 cepas resistentes. Desde el inicio de la era de los antibióticos, se han documentado fenómenos de resistencia, identificándose cepas como *Staphylococcus aureus*, que se ha vuelto resistente a la penicilina debido a su capacidad de degradar este medicamento. Esta cepa está resurgiendo, mostrando resistencia también a la meticilina. Aunque se pensó que el desarrollo de nuevos antibióticos podría solucionar el problema, con la aparición de fármacos como macrólidos, glicopéptidos y aminoglucósidos que han tenido éxito contra

infecciones, también han emergido nuevos mecanismos de resistencia que son difíciles de controlar. Esto ha dado lugar a bacterias multirresistentes, cuyas infecciones causan significativa morbilidad y mortalidad <sup>(29)(30)</sup>.

Entre los diversos factores que han contribuido al aumento significativo de la resistencia bacteriana, podemos mencionar la presión selectiva provocada por la prescripción oficial o gratuita de medicamentos para uso terapéutico, el uso generalizado de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en cuidados intensivos. unidad., uso de dosis o duración insuficientes y desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los microorganismos aislados<sup>(29)</sup>.

### **2.6.1. Resistencia natural**

La resistencia natural se refiere a la capacidad inherente y duradera de ciertas cepas de la misma especie bacteriana, determinada genéticamente y sin relación con la dosis de antibiótico. Ejemplos de esto incluyen la resistencia de *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas, que se debe a su capacidad natural de excreción de antibióticos, así como a la colistina, debido a la presencia de lipopolisacáridos que disminuyen la afinidad de los antibióticos polipeptídicos por su objetivo. Asimismo, *Klebsiella pneumoniae* es resistente a penicilinas como ampicilina y amoxicilina por su producción natural de betalactamasas, mientras que los bacilos aerobios gramnegativos son resistentes a la clindamicina, ya que carecen de un objetivo específico para este antibiótico.<sup>(31)</sup>

### **2.6.2. Resistencia adquirida**

La resistencia adquirida se presenta en especies bacterianas que, aunque son naturalmente sensibles a los antibióticos, han sufrido cambios genéticos a través de mutaciones o por la incorporación de genes de resistencia. Este tipo de resistencia es evolutivo y su frecuencia está relacionada con el uso de antibióticos. Un ejemplo de esto es la resistencia a las quinolonas en enterobacterias, que se debe a modificaciones en la ADN girasa, o a mutaciones en el gen que codifica las porinas, lo que impide la entrada del antibiótico en el microorganismo. Además, la adquisición de genes de resistencia puede ocurrir mediante plásmidos, transposones e integrones, que facilitan la transferencia de estos genes entre cepas de la misma especie o de especies diferentes.<sup>(31)(32)</sup>.

### **2.6.3. Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química**

El fenotipo de resistencia a los antibióticos causado por la alteración o destrucción de la estructura química es un proceso molecular que implica la producción de enzimas específicas para esta tarea. Las enzimas más reconocidas por destruir la estructura química son las betalactamasas, que actúan mediante la hidrólisis del núcleo betalactámico al romper el enlace amida. Otra enzima destacada es la eritromicina esterasa, que cataliza la hidrólisis de la lactona en los antibióticos. Las enzimas que provocan cambios estructurales incluyen la cloranfenicol acetiltransferasa y otras que modifican aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas.<sup>(33)</sup>

### **2.6.4. Alteración del sitio blanco**

La resistencia bacteriana debido a la alteración de los sitios de acción de los antibióticos se basa en cambios específicos en ciertas estructuras de la célula bacteriana, como la pared celular, la membrana, o las subunidades ribosómicas 50S y 30S. Estos son los puntos donde actúan antibióticos como aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas. Por ejemplo, cuando se produce una metilación del ARN ribosómico en la subunidad 50S, se genera resistencia en bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* contra antibióticos como tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos.<sup>(34)</sup>

### **2.6.5. Alteración de las barreras de permeabilidad**

Este mecanismo resulta de cambios en receptores bacterianos específicos para agentes antimicrobianos o cambios estructurales en componentes de la envoltura celular bacteriana (membrana o pared celular) que afectan la permeabilidad y pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o bombas de eflujo que se activan cuando el antibiótico ingresa a la célula bacteriana<sup>(35)</sup>.

La membrana celular de las bacterias Gram-negativas presenta un mayor contenido de lípidos en comparación con las bacterias Gram-positivas. En su membrana externa, aproximadamente el 40% está compuesto por lipopolisacáridos, lo que crea una barrera efectiva que puede limitar el paso de antibióticos, dependiendo de la composición química de la bacteria. Los compuestos hidrofílicos ingresan a través de canales en la membrana interna llamados porinas. Estos canales contienen agua, por lo que la capacidad de los agentes antibacterianos para penetrar depende del tamaño de la molécula, su hidrofobicidad y su carga eléctrica.<sup>(35)</sup>

### **2.6.6. Bombas de eflujo**

La membrana celular cuenta con las llamadas bombas de eflujo, encargadas de la entrada y expulsión de agentes antimicrobianos. Una diversidad de estas bombas contribuye a la resistencia antimicrobiana en bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. El transporte activo de antibióticos hacia el exterior de la célula es facilitado por proteínas transmembrana. En las bacterias gramnegativas, además, estas proteínas también están presentes en la membrana externa y el citoplasma, formando canales que expulsan los antimicrobianos de la célula tan rápido como ingresan.<sup>(35)</sup>.

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Tipo

La presente investigación es de tipo experimental in vitro de corte transversal con un enfoque cuantitativo.

#### 3.2. Diseño

El diseño de investigación es experimental porque se manipularon las variables de estudio, dependiente (*Streptococcus mutans*), independiente (*Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum*).

#### 3.3. Población y muestra

La población de estudio se conformó de 15 muestras distribuidas de la siguiente manera: 8 que contienen *Lactobacillus delbrueckii*, 6 en agar MRS y 2 en agar Mueller; y 7 que contienen *Lactobacillus fermentum*, 4 en agar MRS y 3 en agar Mueller. Dentro de las muestras se colocaron 4 discos impregnados con caldo de *S. mutans* en cada una, dando un total de 60 halos de inhibición que se evaluaron.

#### 3.4. Criterios de selección

- Cepa ATCC *Streptococcus mutans* Clarke 25175 (NCTC 10449 [IFO 13955])
- Medicamento probiótico a base de especies de *Lactobacillus* de interés
- Medicamento probiótico con la aprobación y certificación de la FDA
- Microorganismos con estudios previos de acción probiótica

#### 3.5. Entorno

La presente investigación se realizó dentro de los laboratorios de la Universidad Nacional de Chimborazo, de la Carrera de Pedagogía de las Ciencias Experimentales, Química y Biología de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Facultad de Ciencias de la Educación, Humanas y Tecnologías, Campus La Dolorosa.

#### 3.6. Técnicas e instrumentos

**Técnica:** Observación

**Instrumento:** Bitácora de laboratorio, estereomicroscopio

### **3.7. Intervenciones**

Se usó una cepa de *Streptococcus mutans* y medicamento probiótico (Lacteolfort) el cual contiene dos especies de *Lactobacillus*; se realizó una reactivación de las bacterias en agar y posteriormente un análisis de inhibición haciendo uso de cajas Petri y discos de papel filtro.

La población de estudio se conformó a través de un muestreo no probabilístico por conveniencia teniendo en cuenta estudios previos realizados, por lo que, se seleccionó microorganismos de interés clínico en odontología correspondientes a *Streptococcus mutans* (Principal bacteria cariogénica), *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum*

#### **Fase 1: Gestión Administrativa**

Para llevar a cabo el estudio propuesto, se hizo la documentación correspondiente para poder tener acceso a las instalaciones de la universidad; todo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología, de la Carrera de Pedagogía de las Ciencias Experimentales, Química y Biología ubicado en el Campus “La Dolorosa”, el cual está a cargo del Mgs. Luis Mera Cabezas, previo acuerdo con la Técnico de Laboratorio (Lic. Mercedes Moreta) como se indica en el anexo 1.

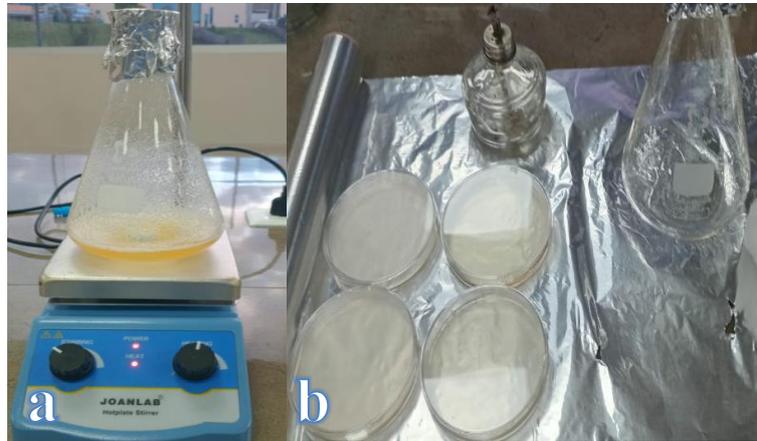
#### **Fase 2. Selección y reactivación de las muestras**

La población de estudio se conformó a través de un muestreo no probabilístico por conveniencia teniendo en cuenta estudios previos realizados, por lo que, se seleccionó la cepa tipo ATCC 25175 correspondiente a *Streptococcus mutans* (Anexo2.). En cuanto a los *Lactobacillus* se realizó la compra del medicamento denominado de manera comercial Lacteolfort 340mg cápsulas (Anexo 2), el mismo que contiene los microorganismos de la especie *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum*.

Posteriormente se realizó la preparación de agar MRS; la indicación del fabricante menciona que se usan 38g por litro de agua, en nuestro caso se necesitaban preparar 4 cajas Petri con capacidad de 15ml cada una, para lo cual se usaron 2.28g disueltos en 60ml de agua purificada, la fotografía 1 muestra el matraz con el medio de cultivo sobre la estufa de calentamiento que luego se llevó a las cajas Petri. A continuación, en un tubo de ensayo con 3ml de agua purificada previamente llevada a ebullición y dejada reposar hasta alcanzar temperatura ambiente se colocó el contenido de una cápsula del medicamento (Lacteolfort), el proceso se encuentra evidenciado en la fotografía 2. Al final como se detalla en la fotografía 3, con un isopo estéril se reactivaron los *Lactobacillus* desde el suero del tubo de ensayo a las cajas Petri con agar MRS, se puso en anaerobiosis en la estufa de crecimiento

BIOBASE BJPX-H50II de 50 litros detallada en la fotografía 4 y se lo dejo reposar a 37°C por 48 horas.

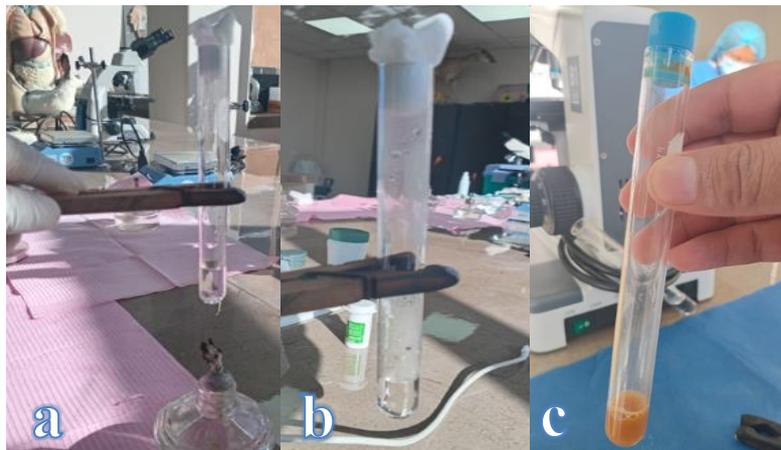
**Fotografía 1.** Plaqueo del medio de cultivo en cajas Petri



a) Preparación de agar MRS; b) Plaqueo del medio de cultivo.

Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 2.** Caldo de *Lactobacillus spp.*



a) Calentamiento del tubo de ensayo con agua purificada; b) Enfriamiento del tubo de ensayo a temperatura ambiente; c) Preparación del caldo con el contenido del medicamento

Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 3.** Siembra de *Lactobacillus spp.*



Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 4.** Incubación de la muestra en anaerobiosis



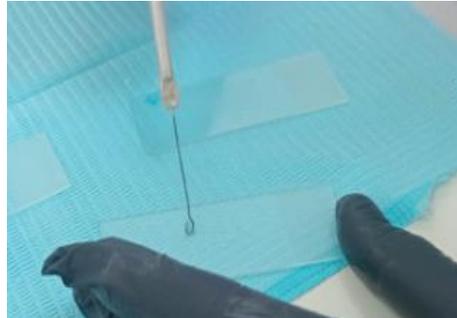
Fuente: Registro fotográfico del autor

### **Fase 3. Identificación de muestras**

Tras 48 horas se observó el crecimiento de los *Lactobacillus*. Posteriormente se realizó una identificación mediante técnica de observación de las cepas de *Lactobacillus* que se desarrollaron a partir del caldo. Se identificaron 4 cepas distintas a partir de las cuales se realizó resiembras en medio de cultivo agar MRS y agar MUELLER los cuales se dejaron en la estufa de crecimiento durante 48 horas a 37°C. A continuación, para diferenciar los microorganismos se realizó la técnica de tinción gram y después observación en el microscopio electrónico. Para la tinción gram se colocó una gota de agua purificada sobre el portaobjeto, subsiguiente se encendió el mechero para crear un ambiente de esterilidad en donde se calentó el asa de siembra y se realizó un frotis extraído de las muestras de

*Lactobacillus spp.* previamente sembradas. En la fotografía 5 se observa cómo se extendió las colonias de *Lactobacillus spp.* sobre la gota de agua destilada en sus respectivos portaobjetos que fueron fijados con calor.

**Fotografía 5.** Muestras fijadas en los portaobjetos



Fuente: Registro fotográfico del autor

A continuación, se distribuyó cristal violeta sobre los portaobjetos durante 1 minuto, realizando movimientos rotatorios para esparcir la solución y se enjuagó con agua purificada. El proceso se repitió nuevamente, pero con Lugol y al final se colocó decolorante y safrarina pero con la variación que cada uno tuvo un tiempo de acción de 30 segundos a diferencia a de los dos anteriores. Al final se lavó nuevamente con agua purificada y se dejó secar, lo que se puede evidenciar en la fotografía 6.

**Fotografía 6.** Proceso de tinción Gram.



Fuente: Registro fotográfico del autor

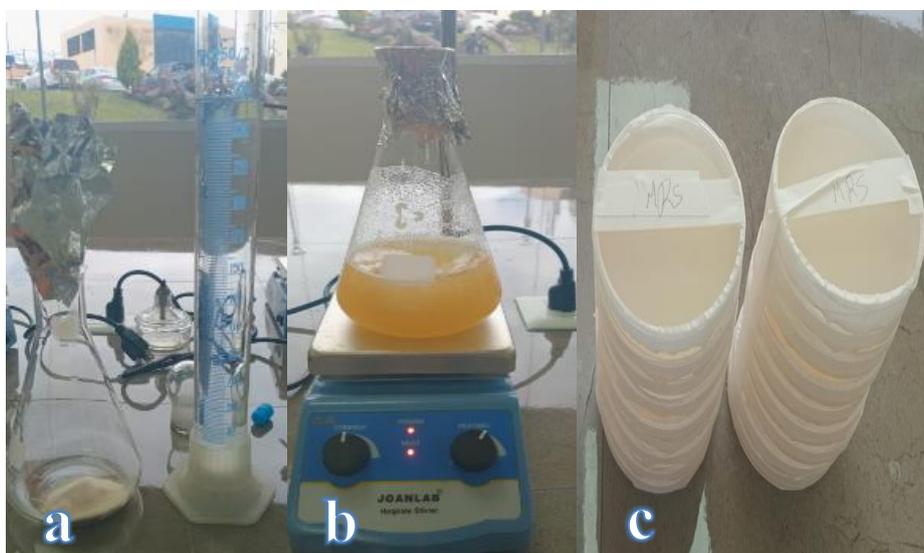
Una vez concluida la tinción gram, se colocaron los portaobjetos bajo el microscopio electrónico en donde se identificó la forma y tamaño de los microorganismos logrando diferenciar las cepas de *Lactobacillus spp.*, que se usaron para el estudio de inhibición. Se

selecciono la cepa #1 correspondiente a *Lactobacillus delbrueckii* y la cepa #3 correspondiente a *Lactobacillus fermentum*

#### Fase 4. Análisis de inhibición

Para realizar el análisis de inhibición se usaron los medios de cultivo de agar MRS y Agar Mueller tal como se muestra en la fotografía 7 el proceso de preparación. Se realizó la réplica de la cepa de *S. mutans* en agar Mueller al igual que la réplica de las muestras #1, #2, #3 y #4 de *Lactobacillus spp.* en los dos tipos de medios de cultivo, las que se dejaron en la estufa de crecimiento por 48 horas.

**Fotografía 7.** Preparación de medios

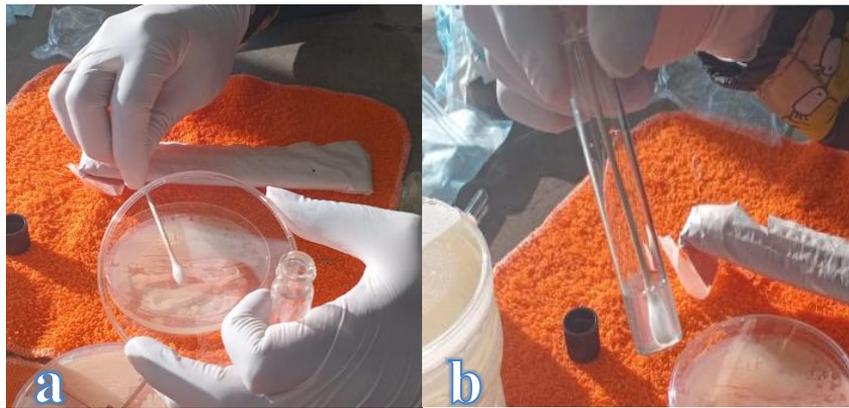


a) Dosificación del medio de cultivo; b) Preparación del medio en la estufa; c) Agar en cajas petri de 15ml.

Fuente: Registro fotográfico del autor

A continuación, después de la identificación de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* (Muestra #1) y *Lactobacillus fermentum* (Muestra #3) realizada en la fase anterior, se aprecia en la fotografía 10 como se hizo la preparación los medios de cultivo inoculando las muestras seleccionadas de *Lactobacillus spp.* Al mismo tiempo se empaparon los discos de papel filtro con caldo que contenía *S. mutans* (fotografía 8) y una vez listo, se procedió a colocar los discos en las cajas Petri (fotografía 9, fotografía 10). Posteriormente las placas se incubaron en ambiente anaeróbico a 37°C durante 24 y 48 horas para permitir el crecimiento y observar la formación de halos inhibitorios, proceso que se evidencia en la fotografía 11 y fotografía 12.

**Fotografía 8.** Caldo con *S. mutans*



a) Frotis extraído de replica de *S. mutans*; b) Caldo con agua purificada y muestra de *S. mutans*

Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 9.** Inoculación de *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum* en medios de cultivo.



a) Frotis extraído de muestra #1 y #3 de *Lactobacillus spp.* ; b) Inoculación en medios de cultivo.

Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 10.** Preparación de discos de inhibición.



Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 11.**Muestras preparadas



Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 12.** Muestras en estufa de crecimiento



Fuente: Registro fotográfico del autor

Al culminar esta fase se realizaron un total de 22 muestras de las cuales 11 corresponden a la muestra #1 (*Lactobacillus delbrueckii*) y 11 a la muestra #3 (*Lactobacillus fermentum*) que a su vez se subdividen en 6 muestras inoculadas en agar MRS Y 5 muestras inoculadas en agar Mueller para cada tipo de *Lactobacillus spp.*

#### **Fase 5. Medición de los halos inhibitorios**

Transcurridas 24 horas en la estufa de crecimiento se observó que no todas las muestras eran viables para poder realizar la medición de los halos inhibitorios por lo cual mediante la técnica de observación se descartaron 7 muestras no aptas, dejando un grupo de estudio de 15 muestras optimas conformadas por: 8 muestras de *Lactobacillus delbrueckii* correspondientes a 6 en agar MRS y 2 en agar Mueller; 7 muestras de *Lactobacillus*

*fermentum* correspondientes a 4 en agar MRS y 3 en agar Mueller. Se procedió a la medición de los halos inhibitorios en el estereomicroscopio bajo un aumento de 60x, al terminar se volvieron las muestras a la estufa de crecimiento a 37° C en anaerobiosis para cumplir con las 48 horas. Asimismo, transcurridas 48 horas se procedió a la medición de los halos inhibitorios nuevamente en el estereomicroscopio bajo un aumento de 60x (fotografía 13).

**Fotografía 13.** Estereomicroscopio a 60x



Fuente: Registro fotográfico del autor.

### 3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizará a través del software SPSS para llegar a la conclusión de los objetivos planteados.

### 3.9. Operacionalización de las variables

#### Variable dependiente

- *Streptococcus mutans*

Caracterización	Dimensión	Indicador	Técnica	Instrumento
Bacteria Gram positiva, generadora de ácido láctico, anaerobia facultativa	Formación o no de halo inhibitorio Dimensión en mm del halo inhibitorio	Desarrollo de colonias	Observacional Difusión en agar	Bitácora de laboratorio Estereomicroscopio

## Variable independiente

- *Lactobacillus delbrueckii* – *Lactobacillus fermentum*

---

<b>Caracterización</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Indicador</b>	<b>Técnica</b>	<b>Instrumento</b>
Especies de bacterias facultativas anaerobias, grampositivas, con forma de bastoncillo, capaces de producir ácido láctico	Formación o no de halo inhibitorio  Dimensión en mm del halo inhibitorio	Desarrollo de colonias	Observacional  Difusión en agar	Bitácora de laboratorio  Estereomicroscopio

---

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Efecto inhibitorio de cepas de *Lactobacillus* frente a *S. mutans* mediante la técnica de difusión en agar

En cuanto a los resultados, después de 48 horas en la estufa de crecimiento, se verificó el desarrollo de cepas de *Lactobacillus*, las mismas fueron clasificadas en 4 muestras siendo el factor diferencial la morfología que presentaba el crecimiento siendo evidente su diferencia tal y como se observa en la fotografía 14. Las características diferentes en los crecimientos se deben a que el medicamento Lacteolforte contiene las dos especies de *Lactobacillus* que se usaron en el estudio; *Lactobacillus delbruekii* y *Lactobacillus fermentum*.

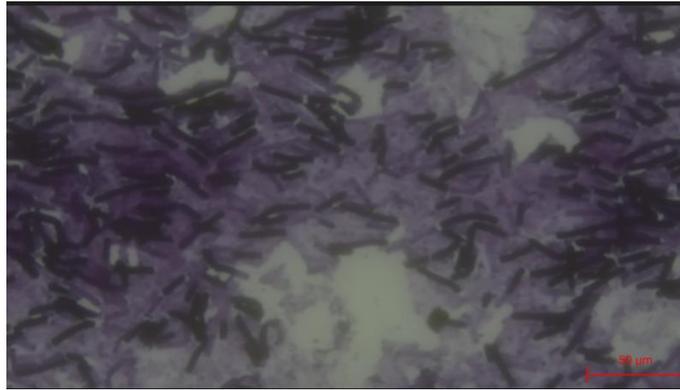
**Fotografía 14.** Diferenciación de cepas de *Lactobacillus spp.*



Fuente: Registro fotográfico del autor

A partir de la diferenciación de las muestras con la técnica observacional, se realizó la tinción gram de las 4 muestras de *Lactobacillus*. Fueron verificadas las características morfológicas de *Lactobacillus delbruekii* y *Lactobacillus fermentum* mediante el microscopio; el primero muestra una forma de bastón que resulta ser más alargada y fácilmente reconocible en la fotografía 15, por otro lado, la segunda especie denota la misma forma de bastón, pero con la diferencia que son mucho más cortos como se evidencia en la fotografía 16. En base a estos criterios de selección tan diferenciados se logró aislar el *Lactobacillus delbruekii* de la muestra #1 y el *Lactobacillus fermentum* de la muestra #3

**Fotografía 15.** Muestra #1 *Lactobacillus delbrueckii*



Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 16.** Muestra #3 *Lactobacillus fermentum*



Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 17.** Replica de *Streptococcus mutans*



Fuente: Registro fotográfico del autor

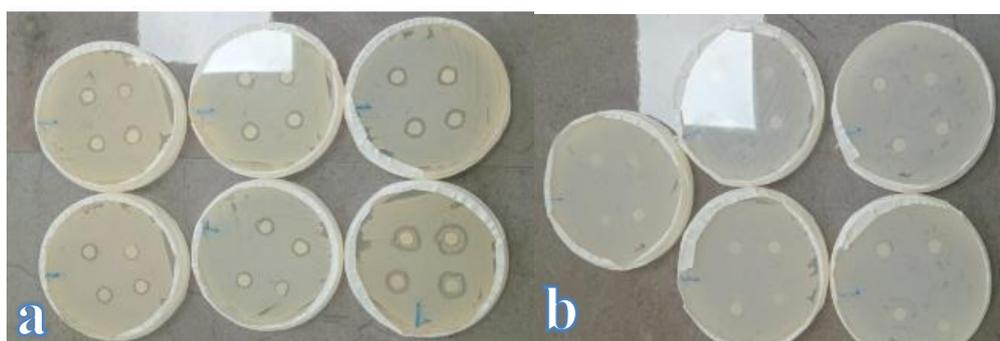
**Fotografía 18.** Replica de *Lactobacillus spp.*



Fuente: Registro fotográfico del autor

Concluida la diferenciación de especies se realizó la resiembra de la cepa de *S. mutans* y las cepas de *Lactobacillus*. El *S. mutans* creció adecuadamente tras 48 horas en la estufa de crecimiento en condiciones de anaerobiosis, resultando como se muestra en la fotografía 17. En cuanto a las réplicas de las dos especies de *Lactobacillus* el crecimiento se dio en base a la siembra, es decir por cuadrante; en la fotografía 18 se puede observar la diferencia morfológica comparando la cepa #1 con la cepa #3 en donde la primera se evidencia un crecimiento más acentuado estriado sin segmentaciones, en cambio en la segunda el crecimiento es más ligero y presenta pequeños segmentos donde forma racimo.

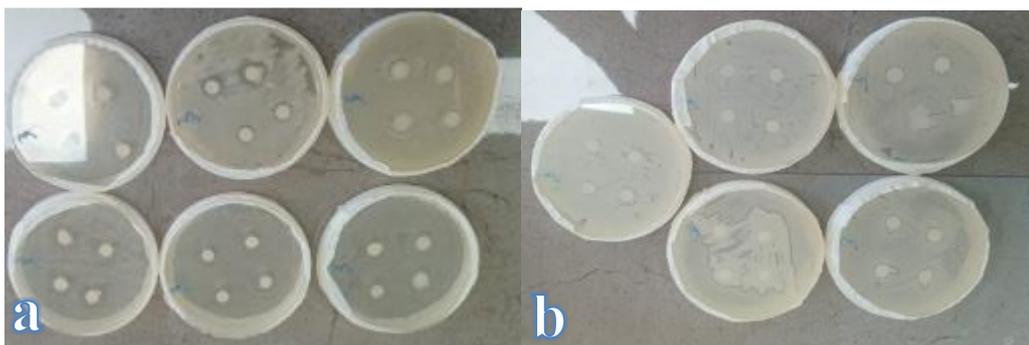
**Fotografía 19.** Muestras de *Lactobacillus delbrueckii* transcurridas 24 horas



a) Muestras e agar MRS; b) Muestras en agar Mueller

Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 20.** Muestras de *Lactobacillus fermentum* transcurridas 24 horas

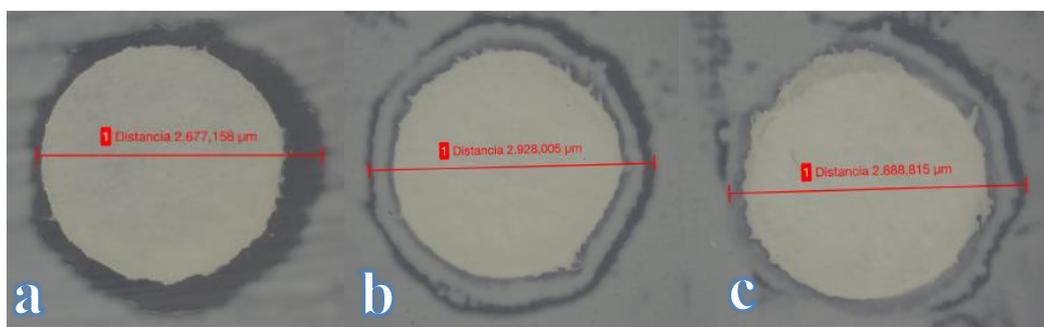


a) Muestras e agar MRS; b) Muestras en agar Mueller

Fuente: Registro fotográfico del autor

Después de las 24 horas se obtuvo crecimiento de las muestras, sin embargo, no todas las muestras ofrecieron resultados regulares óptimos para la medición mediante el estereomicroscopio, como se observa en la fotografía 19, por lo que se dejó durante 48 horas más en la estufa de crecimiento y al retirar las muestras de igual manera los halos inhibitorios de las 7 muestras no se encontraban óptimas para la finalidad del estudio por lo que se retiraron dejando 15 muestras útiles (fotografía 20).

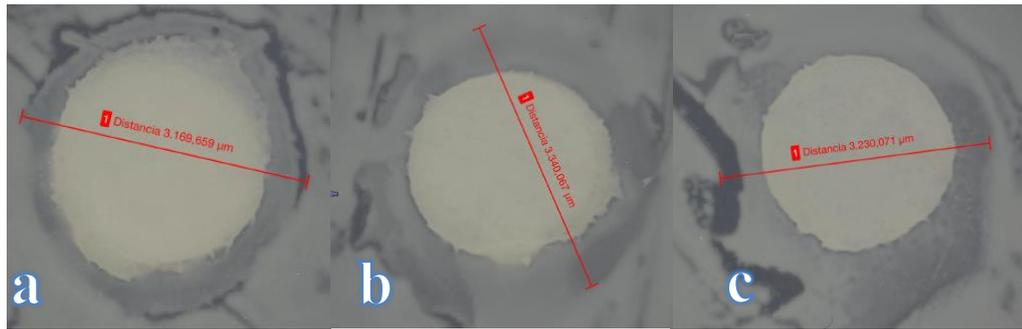
**Fotografía 21.** Halos inhibitorios más representativos *Lactobacillus delbrueckii*



a) Caja 21 halo inhibitorio #3; b) Caja 21 halo inhibitorio #4; c) Caja 22 halo inhibitorio #3

Fuente: Registro fotográfico del autor

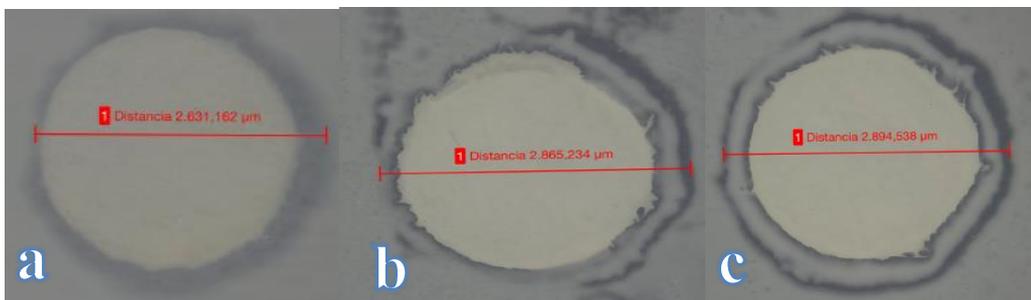
**Fotografía 22.** Halos inhibitorios más representativos *Lactobacillus fermentum*.



Caja 3 halo inhibitorio #4; b) Caja 7 halo inhibitorio #1; c) Caja 7 halo inhibitorio #2.

Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 23.** Halos inhibitorios más representativos *Lactobacillus delbrueckii*



a) Caja 21 halo inhibitorio #3; b) Caja 21 halo inhibitorio #4; c) Caja 22 halo inhibitorio #3

Fuente: Registro fotográfico del autor

**Fotografía 24.** Halos inhibitorios más representativos *Lactobacillus fermentum*



Caja 3 halo inhibitorio #4; b) Caja 7 halo inhibitorio #1; c) Caja 7 halo inhibitorio #2.

Fuente: Registro fotográfico del autor

En cuanto a los halos inhibitorios, se encontró que la caja #3 halo (4) y #7 halo (1), (2), son los en los que presentan mayor longitud de halos inhibitorios tanto a las 24 como 48 horas como se muestran en la fotografía 21 y 23 relacionados a la muestra de *Lactobacillus delbrueckii*. Por otra parte, el *Lactobacillus fermentum* obtuvo mejores resultados de inhibición en las cajas #3, #21 halo (4), #22 halo (3), a las 24 y 48 horas respectivamente, su medición se puede observar en la fotografía 22 y fotografía 24

#### 4.2. Diferencia de potencial inhibitorio entre *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum* sobre *Streptococcus mutans*.

**Tabla 1.** Estadísticos de la longitud de halo inhibitorio por cepa

Cepa	Medición	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Medición	2677.15	5545.08	3569.14	3348.12	726.95
	Halo 24h					
	Medición	2631.16	5545.28	3468.51	3223.11	749.61
	Halo 48h					
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Medición	3411.21	5576.54	4382.77	4321.51	769.85
	Halo 24h					
	Medición	3374.97	5565.67	4294.91	4244.22	740.90
	Halo 48h					

#### Análisis:

El análisis de la tabla 1, muestra los estadísticos de la longitud del halo inhibitorio por cepa (*Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum*) a las 24 y 48 horas, encontrando diferencias notables entre ambas cepas y cambios leves con el tiempo. *L. fermentum* muestra un mayor potencial inhibitorio contra *Streptococcus mutans*, con medias de halo más altas (4382.77 a 24h y 4294.91 a 48h) en comparación con *L. delbrueckii* (3569.14 a 24h y 3468.51 a 48h). Ambas cepas experimentan una ligera disminución en la media del halo inhibitorio de 24 a 48 horas, sugiriendo una leve reducción en la eficacia inhibitoria con el tiempo. La variabilidad, indicada por la desviación estándar (DE), es similar entre las cepas y tiempos, aunque ligeramente mayor en *L. delbrueckii* a las 48 horas. Los valores mínimos y máximos indican un rango más amplio para *L. delbrueckii*, lo que podría sugerir una mayor variabilidad en su efecto inhibitorio. Las medianas, generalmente cercanas a las medias, indican distribuciones relativamente simétricas. En conjunto, estos datos indicarían que *L. fermentum* tiene un efecto inhibitorio más fuerte y consistente sobre *S. mutans* en comparación con *L. delbrueckii*, aunque ambas cepas muestran una leve disminución en su eficacia con el tiempo.

### 4.3. Potencial inhibitorio de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum* sobre *Streptococcus mutans*

**Tabla 2** Efecto inhibitorio (um) mediante técnicas de difusión en Agar

Agar	Medición	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Desviación estándar
<b>Agar MRS</b>	Medición Halo 24h	2677.15	5576.54	3912.02	3561.89	853.17
	Medición Halo 48h	2631.16	5565.67	3806.18	3404.04	867.17
<b>Agar Mueller</b>	Medición Halo 24h	2888.81	4104.98	3421.6	3411.21	529.04
	Medición Halo 48h	2865.23	4080.71	3388.51	3403.38	522.84

Análisis:

El análisis de la tabla que compara los estadísticos de la longitud del halo inhibitorio en los agares MRS y Mueller a las 24 y 48 horas revela diferencias significativas en cómo estos medios afectan la expresión del potencial inhibitorio de las cepas estudiadas. El agar MRS facilita la formación de halos inhibitorios generalmente más grandes y variables, con medias de 3912.02 a las 24h y 3806.18 a las 48h, y desviaciones estándar elevadas de 853.17 y 867.17 respectivamente. En contraste, el agar Mueller produce halos más pequeños y uniformes, con medias de 3421.6 a las 24h y 3388.51 a las 48h, y desviaciones estándar menores de 529.04 y 522.84. Esta diferencia sugiere que el agar MRS podría ser más sensible para detectar variaciones en la capacidad inhibitoria entre cepas, permitiendo una mayor expresión de este potencial. Por otro lado, el agar Mueller parece ofrecer resultados más consistentes, pero posiblemente menos discriminatorios. Ambos agares muestran una leve disminución en el tamaño del halo de 24 a 48 horas, indicando una reducción general del efecto inhibitorio con el tiempo independientemente del medio. La distribución de los datos también difiere: en el agar MRS, las medianas son notablemente más bajas que las medias, sugiriendo una distribución sesgada hacia valores más altos, mientras que en el agar Mueller, las medianas y medias son más cercanas, indicando una distribución más simétrica. Estas diferencias entre los agares son cruciales para interpretar los resultados de los ensayos de inhibición y podrían influir significativamente en la evaluación del potencial antimicrobiano de las cepas estudiadas.

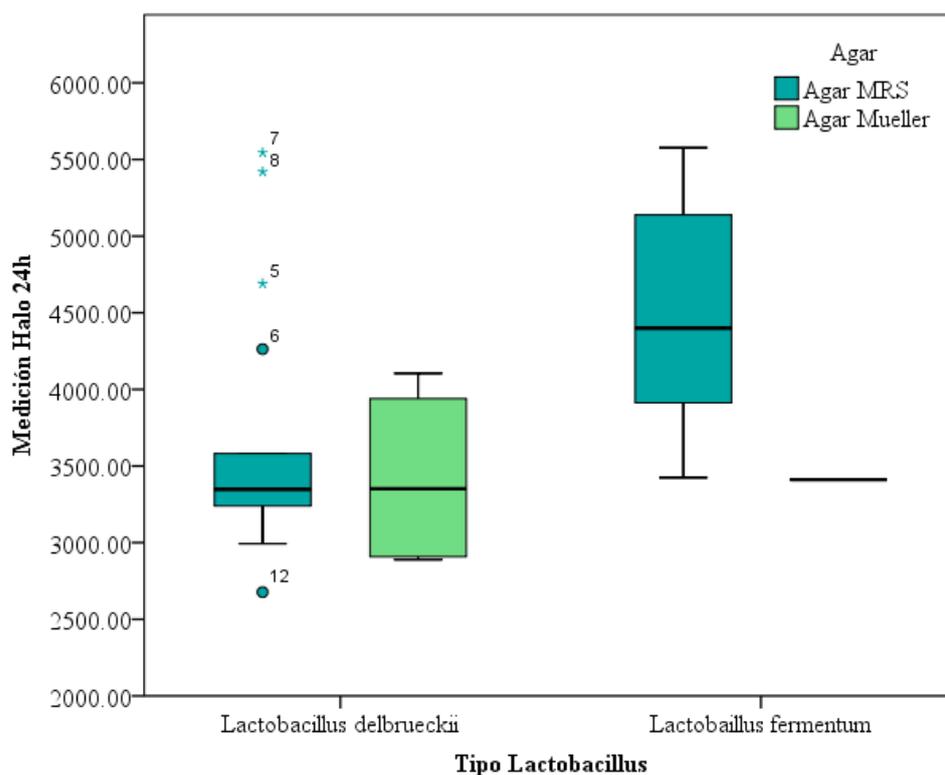
**Tabla 3** Medición del halo inhibitorio por cepa y Agar

	Halo	Agar MRS			Agar Mueller		
		Media	Med	DE	Media	Med	DE
<b>Lactobacillus delbrueckii</b>	24h	3596.75	3348.12	757.08	3424.2	3351.51	610.84
	48h	18756.62	3223.11	69934.13	3384.8	3296.63	603.64
<b>Lactobacillus fermentum</b>	24h	4463.73	4399.32	744.03	3475.56	3375.64	315.41
	48h	4369.2	4294.42	721.5	3466.52	3342.79	334.67

Análisis:

La tabla muestra el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus fermentum* en Agar MRS y Agar Mueller a 24 y 48 horas, destacando que *L. delbrueckii* presenta un crecimiento mucho más variable, especialmente en Agar MRS a 48 horas, donde la media es alta (18756.62 mm) pero con una enorme desviación estándar (69934.13 mm), lo que sugiere inestabilidad o factores externos que influyen en su desarrollo. Por otro lado, *L. fermentum* muestra un crecimiento más uniforme y consistente en ambos medios, con menores variaciones y una estabilidad notable entre 24 y 48 horas, particularmente en Agar Mueller, que se presenta como un entorno más estable para ambas especies, evidenciado por desviaciones estándar más bajas en comparación con el Agar MRS.

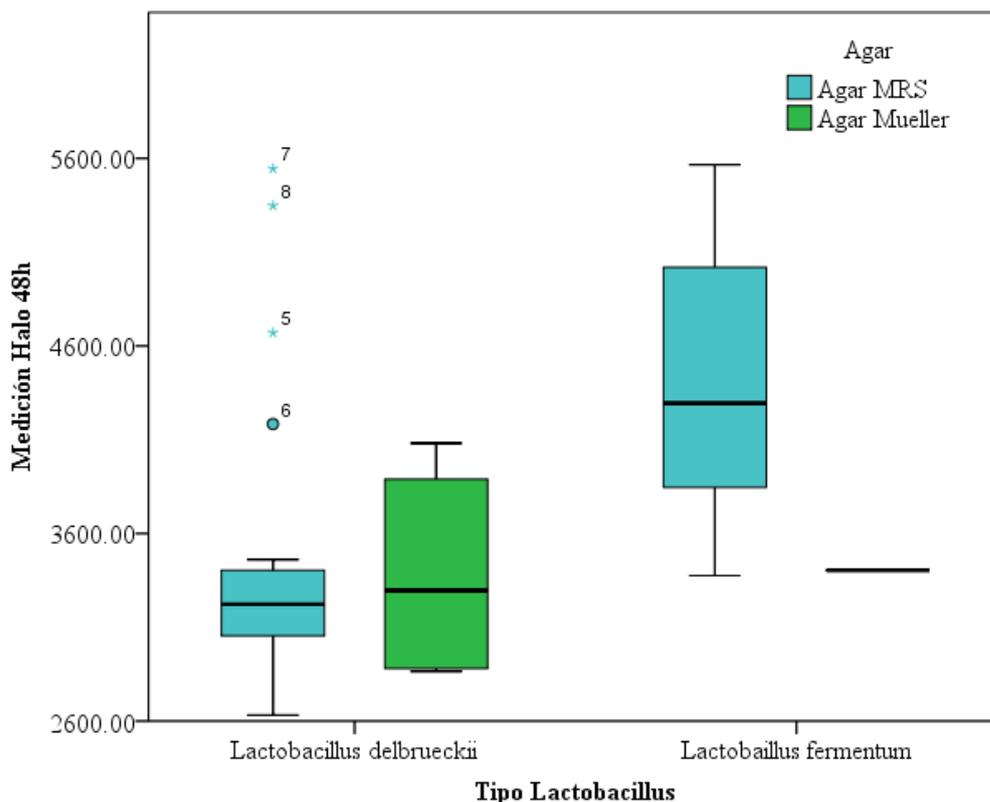
**Gráfico 1.** Efecto inhibitorio (um) mediante técnicas se Agar a las 24 horas



Análisis:

El gráfico compara el halo inhibitorio a las 24 horas de *Lactobacillus delbrueckii* y *L. fermentum* en agares MRS y Mueller. *L. fermentum* muestra halos generalmente más grandes, indicando mayor potencial inhibitorio, especialmente en agar MRS donde también presenta mayor variabilidad. El agar MRS produce halos más grandes y variables para ambas especies, sugiriendo mayor sensibilidad para detectar diferencias en la actividad inhibitoria. En contraste, el agar Mueller genera resultados más consistentes, pero menos discriminatorios, particularmente para *L. fermentum*. *L. delbrueckii* exhibe variabilidad considerable en ambos agares, con algunos valores atípicos altos en MRS. Notablemente, *L. fermentum* en agar Mueller muestra solo un punto, lo que podría indicar datos limitados o muy consistentes. Un valor atípico bajo para *L. delbrueckii* en MRS sugiere una muestra con actividad inhibitoria inusualmente reducida. En general, el gráfico revela que la elección del agar influye significativamente en la expresión y medición de la actividad inhibitoria de estas especies de *Lactobacillus*, con el agar MRS permitiendo una mayor diferenciación entre cepas.

**Gráfico 2.** Efecto inhibitorio (um) mediante técnicas se Agar a las 48 horas



Análisis:

Este gráfico de caja y bigotes compara el halo inhibitorio a las 48 horas de *Lactobacillus delbrueckii* y *L. fermentum* en agares MRS y Mueller. *L. fermentum* muestra halos generalmente más grandes, especialmente en agar MRS, indicando un mayor potencial inhibitorio sostenido. El agar MRS produce una mayor variabilidad en los resultados para ambas especies, con cajas más grandes y varios valores atípicos para *L. delbrueckii*. En contraste, el agar Mueller genera resultados más consistentes, con rangos más estrechos. *L. delbrueckii* presenta una distribución más compacta en agar MRS a las 48h comparado con la medición a 24h, pero mantiene algunos valores atípicos altos. Curiosamente, *L. fermentum* en agar Mueller muestra solo un punto, sugiriendo datos limitados o muy consistentes. La variabilidad en el tamaño del halo es notablemente mayor para *L. fermentum* en agar MRS, indicando que este medio podría ser más sensible para detectar diferencias en la actividad inhibitoria prolongada de esta especie. En general, el gráfico refuerza la idea de que la elección del agar influye significativamente en la medición de la actividad inhibitoria sostenida de estas especies de *Lactobacillus*, con el agar MRS permitiendo una mayor diferenciación entre cepas incluso después de 48 horas.

#### **4.4. Pruebas de hipótesis**

En el caso de las variables cuantitativas denotaron en la pruebas de normalidad de Shapiro Wilk valores ( $p=0.01$ ; Medida de halo a las 24 h), ( $p=0.01$ ; Medida de halo a las 48 h). Por tanto, las pruebas que se usarán para contrastar las hipótesis serán de tipo no paramétrico.

##### **Hipótesis 1**

$H_0$  = No existen diferencias significativas entre los halos inhibitorios entre las *lactobacilus* a las 24 h

Error: 5%

IC=95%

Decisión: Si  $p < 0.05$  se rechaza  $H_0$

Estadístico de prueba

**Tabla 4.** Prueba U de Man Whitney H1

	Medición Halo 24h
U de Mann-Whitney	59
W de Wilcoxon	384
Z	-3.185
Sig. asintótica (bilateral)	0.001
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	.001b

a Variable de agrupación: Tipo *Lactobacillus*

b No corregido para empates.

Los resultados muestran un valor U de 59, un estadístico Z de -3.185, y una significación asintótica bilateral de 0.001, que es menor que el nivel de significancia establecido de 0.05 (5%). Dado que  $p < 0.05$ , se rechaza la hipótesis nula con un 95% de confianza. Esto lleva a la conclusión de que existen diferencias estadísticamente significativas entre los halos inhibitorios de las especies de *Lactobacillus* a las 24 horas. La significación exacta bilateral de 0.001 refuerza esta conclusión, indicando que la probabilidad de obtener estos resultados por azar es muy baja. Por lo tanto, se puede inferir que las especies de *Lactobacillus* estudiadas muestran diferentes potenciales inhibitorios a las 24 horas, lo que sugiere variaciones importantes en su actividad antimicrobiana contra el organismo objetivo

## Hipótesis 2

$H_0$  = No existen diferencias significativas entre los halos inhibitorios entre los *Lactobacillus* a las 48 h

Error: 5%

IC=95%

Decisión: Si  $p < 0.05$  se rechaza  $H_0$

Estadístico de prueba

**Tabla 5.** Prueba U de Man Whitney H2

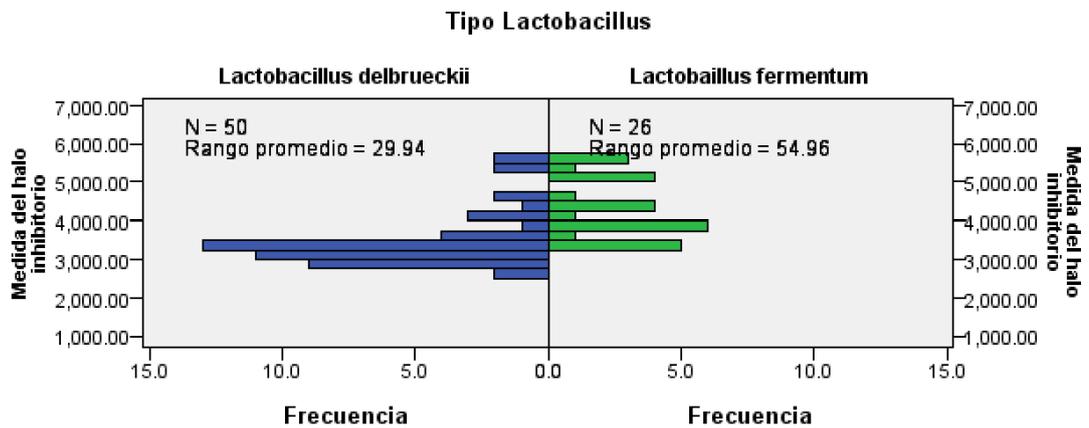
	Medición Halo 48h
U de Mann-Whitney	51
W de Wilcoxon	376
Z	-3.431
Sig. asintótica (bilateral)	0.001
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	.000b

a Variable de agrupación: Tipo *Lactobacillus*

b No corregido para empates.

Los resultados muestran un valor U de 51, un estadístico Z de -3.431, y una significación asintótica bilateral de 0.001, que es menor que el nivel de significancia establecido de 0.05 (5%). La significación exacta bilateral es 0.000, reforzando aún más la evidencia estadística. Dado que  $p < 0.05$ , se rechaza la hipótesis nula con un 95% de confianza. Por lo tanto, se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas entre los halos inhibitorios de las especies de *Lactobacillus* a las 48 horas. Estos resultados indican que las distintas especies de *Lactobacillus* mantienen diferentes potenciales inhibitorios incluso después de 48 horas, sugiriendo variaciones persistentes y significativas en su actividad antimicrobiana contra el organismo objetivo. Esta conclusión es consistente con las observaciones a las 24 horas, demostrando que las diferencias en la capacidad inhibitoria entre las especies de *Lactobacillus* se mantienen a lo largo del tiempo.

**Gráfico 3.** Comparación por tipo de lactobacillus



El análisis de la hipótesis nula ( $H_0$ ) que establece que no existen diferencias significativas entre los halos inhibitorios de las especies de *Lactobacillus* respecto al *Streptococcus mutans* se realiza mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los resultados muestran un valor U de 222, un estadístico Z de -4.686, y una significación asintótica bilateral de 0.00, que es menor que el nivel de significancia establecido de 0.05 (5%). Dado que  $p < 0.05$ , se rechaza contundentemente la hipótesis nula con un 95% de confianza. Esto se corrobora con el gráfico presentado, que muestra diferencias notables en la distribución y rango promedio de los halos inhibitorios entre *Lactobacillus delbrueckii* (N=50, rango promedio=29.94) y *Lactobacillus fermentum* (N=26, rango promedio=54.96). La diferencia en los rangos promedio y la asimetría en las distribuciones de frecuencia respaldan visualmente la conclusión estadística. Por lo tanto, se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas entre los halos inhibitorios de las especies de *Lactobacillus* respecto al *Streptococcus mutans*, lo que sugiere que las dos especies de *Lactobacillus* tienen efectos

inhibitorios significativamente diferentes sobre el crecimiento de *S. mutans*, con *L. fermentum* mostrando un efecto inhibitorio aparentemente más fuerte y variable.

#### 4.5. Discusión

En los resultados obtenidos en el presente estudio, el potencial inhibitorio de las cepas de *Lactobacillus delbruekii* y *Lactobacillus fermentum* a las 24 y 48 horas varía ligeramente de acuerdo con la tabla 2 del apartado de resultados, en donde el *L. fermentum* presenta un mayor y más consistente potencial inhibitorio contra *S. mutans*. Concordando con nuestros resultados un estudio realizado por Torrez W., Bueno Z.<sup>(1)</sup>, el potencial inhibitorio de las colonias de *Lactobacillus fermentum* igualmente resultó eficaz ya que se verificaron varias zonas de inhibición de diferente tamaño en las colonias de *S. mutans*, lo comprobaron mediante el test Api 50 CH identificando a la cepa de *Lactobacillus Z2* (*Lactobacillus fermentum*), como la mayor cepa productora de sustancia antagónica. La diferencia entre este estudio y el realizado es que se comparó *Lactobacillus delbruekii* y *Lactobacillus fermentum* mientras que Torres et al, compararon *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei*, ambos evaluando su capacidad inhibitoria contra *S. mutans*.

Otro aspecto importante es la longitud de los halos inhibitorios obtenidos, en el presente estudio se obtuvieron longitudes que varían entre 2.67mm a 5.57mm a las 24 horas y de 2.63mm a 5.56 mm a las 48 horas lo que demuestra el potencial inhibitorio del *Lactobacillus delbruekii* y *Lactobacillus fermentum* frente a *S. mutans*. Azizian K., y col.<sup>(36)</sup> por su parte al realizar un estudio de inhibición propio mediante método de difusión en donde usaron *L. fermentum*, *L. delbruekii* también obtuvieron halos de inhibición, sin embargo, sus datos varían de la presente investigación ya que determinaron zonas inhibitorias de un rango de 17 a 23mm a las 48 horas, demostrando el potencial inhibitorio de los *Lactobacillus*, pero con una diferencia circunstancial en la longitud de los halos, de igual manera cabe mencionar que en su estudio usaron más de 30 especies diferentes de *Lactobacillus spp.*, entre los que se encontraban *L. fermentum*, *L. delbruekii*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. vaginalis*, *L. curvatus* etc., y las pusieron a prueba contra especies patógenas como *K. pneumonia*, *S. typhimurium*, *Y. faecalis*, *E. faecium*, *S. mutans*, etc., obteniendo así más riqueza en sus resultados. Lee et al.<sup>(37)</sup> en su estudio comparativo en donde usaron *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, etc., demostraron que tenían una fuerte actividad antimicrobiana contra *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, inhibiendo las biopelículas, específicamente los genes glucosiltransferasas, de esta manera disminuyendo la producción de glucanos previniendo la caries dental; en comparación a la presente investigación se diferencia porque en lugar de medir halos

inhibitorios realizaron pruebas de secuencia de aminoácidos , pero, ambos concuerdan en que los *Lactobacillus* presentan un alto potencial inhibitorio. Además, Tahmourespour et al<sup>(38)</sup>, en su estudio in vitro demostraron que en presencia de *L. acidophilus* y *L. delbruekii* hubo una menor adherencia de *S. mutans* al esmalte dental, determinando que los *Lactobacillus* compiten por sitios de adherencia y factores de crecimiento en el medio bucal. Un último marcador de importancia en el estudio realizado fue el uso de agar Mueller o MRS, en donde según la tabla 3 la longitud de los halos reveló diferencias significativas en base al medio de cultivo, obteniendo que el agar MRS facilita el desarrollo de los microorganismos. Este resultado exceptuando a Tahmourespour et al<sup>(38)</sup>, concuerda con los autores antes mencionados ya que en sus estudios inhibitorios usaron agar MRS, siendo la razón que este medio es apropiado para el aislamiento y recuento de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas.

Para finalizar y a manera de contribución los autores Aguilar B., Balcázar E., Paramo B.<sup>(39)</sup> mencionan que el actuar de la bacteriocina (sustancia antagónica) producida por los *Lactobacillus* es crear poros en la membrana del *S. mutans* causando un vaciamiento celular que libera el contenido de la célula llevándola a muerte celular causando la inhibición de la misma. Además, Torres R, López P., Argueta L<sup>(40)</sup>,. en su investigación encontraron que las cepas de *L. plantarium*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, generaban bacteriocinas que al ser segregadas producían una mayor inhibición contra *Actinomyces viscosus* y *S. mutans*. demostrando que el efecto inhibitorio es considerable y respaldando que efectivamente la familia de los *Lactobacillus* son microorganismos que se pueden emplearse para el control de bacterias cariogénicas al usarse como probióticos para terapias a corto plazo.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se observó un mejor potencial inhibitorio por parte de la cepa de *L. delbruekii* el cual tuvo un mejor efecto inhibitorio sobre el *S. mutans*, sin embargo, la actividad inhibitoria de la cepa de *L. fermentum*, aunque con una menor longitud en sus halos también impidió el crecimiento del *S. mutans*, a lo que se puede afirmar que el efecto como protector natural contra patógenos como el *S. mutans*. es positivo

En base a la revisión bibliográfica realizada en la presente investigación la sustancia antagonica conocida como bacteriocina segregada por los *Lactobacillus* es el factor principal asociado a la inhibición de *S. mutans* y como sugieren otros autores citados, en sus estudios el espectro de acción de esta sustancia cubre muchos agentes patógenos además del estudiado en esta investigación, ofreciéndonos resultados positivos para usar probióticos en tratamientos para prevención de caries dental

El efecto inhibitorio de las especies de *Lactobacillus* con las cuales se trabajó, demostró ser positivo, produciendo un halo inhibitorio considerable, siendo más evidente en la especie *L. fermentum*, sin embargo, en estudios de otros autores previamente citados se apoyan una mejor acción inhibitoria por parte de *L. fermentum*. Finalmente se comprobó que las especies de *Lactobacillus* usadas en este estudio demostraron tener un buen efecto inhibitorio contra el *S. mutans* y además al encontrarse en boca de manera natural el efecto inhibitorio puede traducirse como una menor prevalencia de caries

#### 5.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar futuras investigaciones usando mayor cantidad de agentes patógenos relacionados con enfermedades bucales para poder determinar el espectro de acción de las especies de *Lactobacillus*. De la misma manera se recomienda usar diferentes especies de *Lactobacillus*.

Seria de gran ayuda lograr un estudio más completo extrayendo los microorganismos de sujetos en vivo para poder simular una situación real en boca para comprobar de una mejor manera si existe un efecto inhibitorio

Para la identificación de bacterias ácido lácticas se recomienda recurrir a la secuenciación molecular de las bacterias, a fin de determinar su especie, sin embargo, la diferenciación morfológica fue muy evidente al momento de identificar las bacterias durante este estudio

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bustillos Torrez W, Bueno Bravo ZS. Inhibición de *Streptococcus mutans* aislado de cavidad oral de niños sin caries mediante sustancia antagónica producida por *Lactobacillus* spp. *Rev Odontopediatría Latinoam.* 2021;10(1).
2. Parra R. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial BSAA [Internet].* 2010;8(1):93–105. Available from: <https://repositorio.una.edu.ni/738/1/tnq03o48.pdf>
3. Agudelo N, Torres M, Alvarez C, Vélez L. Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido Lácticas Y Su Aplicación En La Industria De Alimentos. *Aliment hoy [Internet].* 2015;23(36):63–72. Available from: <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356>
4. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Vol. 54, Caries Research.* 2020. p. 7–14.
5. Ortega-Peña S, Hernández-Zamora E. Microbial biofilms and their impact on medical areas: Physiopathology, diagnosis and treatment. *Vol. 75, Boletín Médico del Hospital Infantil de México.* 2018. p. 79–88.
6. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections – an update. *Vol. 125, APMIS.* 2017.
7. Ramos O. CA, Ramirez M. EFECTIVIDAD DE DIFERENTES TÉCNICAS EDUCATIVAS ODONTOLÓGICAS EN EL CONTROL DE LA PLACA BACTERIANA EN ESCOLARES. *Rev Salut.* 2018;(1):52–78.
8. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Vol. 28, Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 2005. p. 163–75.
9. Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Vol. 55, Japanese Dental Science Review.* 2019.
10. Eraso E, Sevillano E. OCW. 2013. TEMA 4. LA PLACA DENTAL.
11. Jakubovics NS, Goodman SD, Mashburn-Warren L, Stafford GP, Cieplik F. The dental plaque biofilm matrix. *Periodontol 2000.* 2021;86(1):32–56.

12. Pérez Luyo AG. La Biopelícula: una nueva visión de la placa dental. *Rev Estomatológica Hered.* 2014;15(1).
13. Ramos D, Brañez K. Streptococcus sanguinis y actinomyces viscosus bacterias pioneras en la formación del biofilm dental. *Kiru.* 2016;13(2):181–6.
14. Vieira D. Formación de placa bacteriana ¿Cómo se forma la placa dental? *Clínicas Propdental* [Internet]. 2021; Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/mdc/v24n2/1029-3043-mdc-24-02-337.pdf>
15. Santos Madrigal NO, Moreno A, Lara Flores NL. Caries y salud bucal, percepciones acerca de la enfermedad. *Rev Odontopediatría Latinoam.* 2021;11(2).
16. Henostroza Haro G. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2007. Caries dental: principios y procedimientos para el diagnóstico.
17. carolina caridad. El pH, flujo salival y capacidad buffer en relacion a la formación de la placa dental. *Odous científica* [Internet]. 2008;IX # 1:2–30. Available from: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/odontologia/revista/v9n1/art3.pdf>
18. Meier C, Chamarro W, Peres N, Adhmar N, José N, Roman C. Epidemiological study on the bacterial plaque index and CPO. *Rev Odontol* [Internet]. 2021;23(2):1–7. Available from: <file:///C:/Users/kandr/Desktop/tesis/ART. discusion/5 indice CPOD con relacion al indice de placa/17446.pdf>
19. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Ciências Farm.* 2006;42(1).
20. Silveyra E, Pereira V, Asquino N, Vigil G, Bologna R, Bueno L, et al. Probióticos y enfermedad periodontal. Revisión de la literatura. *Int J Interdiscip Dent.* 2022;15(1).
21. Buriti FCA, Saad SMI. Bactérias do grupo Lactobacillus casei: Caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. Vol. 57, *Archivos Latinoamericanos de Nutricion.* 2007. p. 373–80.
22. Rebolledo M, Rojas E, Salgado F. Efecto de Dos Probióticos que Contienen Cepas de Lactobacillus casei variedad rhamnosus y Lactobacillus johnsonii sobre el Crecimiento in Vitro de Streptococcus mutans. *Int J Odontostomatol.* 2013;7(3).
23. Kullar R, Goldstein EJC, Johnson S, McFarland L V. Lactobacillus Bacteremia and Probiotics: A Review. Vol. 11, *Microorganisms.* 2023.

24. Tormo Carnicé R. Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *An Pediatr Monogr.* 2006;4(1):30–41.
25. Ahmed A, Dachang W, Lei Z, Jianjun L, Juanjuan Q, Yi X. Effect of *Lactobacillus* species on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Pak J Pharm Sci.* 2014;27(5 Spec no):1523–8.
26. Malbrán C. Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Difusión. *Serv Antimicrob* [Internet]. 2018;9–12. Available from: [http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO\\_DE\\_DETERMINACION\\_DE\\_SENSIBILIDAD\\_ANTIMICROBIANA\\_POR\\_DIFUSION\\_2012.pdf](http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_POR_DIFUSION_2012.pdf)
27. Vázquez-Pertejo M. Manual MSD versión para profesionales. 2022. Pruebas de sensibilidad o antibiogramas - Enfermedades infecciosas. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/diagnostico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
28. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. Pruebas De Sensibilidad Bacteriana. Univ Salamanca [Internet]. 2020;06.pp. Available from: [http://campus.usal.es/~micromed/Practicas\\_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html#:~:text=Las pruebas de sensibilidad bacteriana,vivo de un tratamiento antibiótico](http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html#:~:text=Las pruebas de sensibilidad bacteriana,vivo de un tratamiento antibiótico)
29. Treviño N, Molina NB. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. *Mater cátedra Corresp a la CI Gen Bacteriol* [Internet]. 2022;1–9. Available from: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/136280>
30. Taléns-Visconti R, Garrigues TM, Cantón E. Mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas. Vol. 15, *Revista Espanola de Quimioterapia.* 2002. p. 25–31.
31. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica* Microbiología médica NOVENA EDICIÓN NOVENA EDICIÓN NOVENA EDICIÓN *Microbiología médica.* *Med Micro.* 2021;1(9).
32. Francisco Á, Andrea M. La resistencia bacteriana. Generalidades, carbapenemasas y actualidad: una revisión narrativa. *Archivos de medicina universitaria.* 2022;2–6.
33. Pérez H, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana.

- Rev Med (Puebla) [Internet]. 2013;4(04):186–91. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>
34. Sanchez ML. Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de resistencia de los patógenos. Rev la Asoc Bioquímica Argentina [Internet]. 2016;80(1):36–43. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/158837676.pdf>
  35. García Apac C. Resistencia antimicrobiana. Diagnóstico. 2020;57(2):79–81.
  36. Azizian K, Taghizadeh S, Hosseinpour R, Tanomand A, Sheikhsaran E, Alizadeh N, et al. Inhibitory effect of isolated Lactobacillus from oral cavity against bacterial Pathogens and its effect on health promotion. Ars pharm [Internet]. 2019;60(1):27–33. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2340-98942019000100027&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2340-98942019000100027&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
  37. Lee SH, Kim YJ. A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. Arch Microbiol. 2014;196(8).
  38. Tahmourespour A, Kermanshahi RK. The effect of a probiotic strain (Lactobacillus acidophilus) on the plaque formation of oral streptococci. Bosn J Basic Med Sci. 2011;11(1).
  39. Aguilar Uscanga BR, Balcázar López E, Páramo Chávez BF, Rodríguez Arreola A, Solís Aguilar JG, Solís Pacheco JR. Obtención y caracterización de bacteriocinas a partir de bacterias ácido-lácticas aisladas de leche humana. Rev Int Salud, Bienestar y Soc. 2021;7(1).
  40. López YLP, Torres-Rosas R, Argueta-Figueroa L. Mecanismos de acción de los probióticos en la inhibición de microorganismos cariogénicos. Rev Médica Clínica Las Condes. 2023;34(3).

## ANEXOS

### Anexo 1. Oficio dirigido al Mg. Luis Mera para obtener acceso a los laboratorios.



Fuente: Registro fotográfico del autor

### Anexo 2. Materia prima para la obtención de microorganismos



Fuente: Registro fotográfico del autor

