

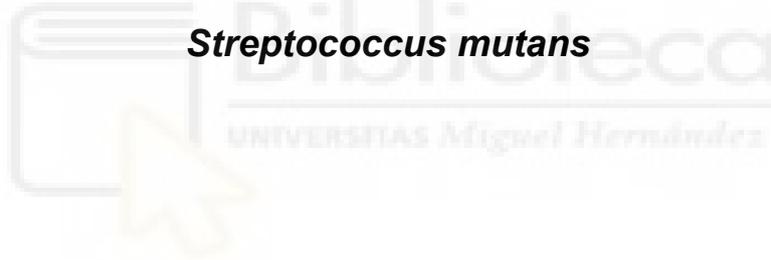
Universidad Miguel Hernández
Facultad de Ciencias Experimentales



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Establecimiento de modelos de biofilm con la bacteria
Streptococcus mutans



Cristina Navarro Baño

Tutor: Manuel Sánchez Angulo

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

Curso 2023 – 2024

Grado en Biotecnología

Resumen y palabras clave

La bacteria *Streptococcus mutans* es la causante de la principal afección de la cavidad bucal: los procesos cariogénicos. Gracias a su capacidad de formación de biofilms dentales (también conocidos como placa dental) este organismo es capaz de persistir en diversos focos de infección, ya que la viabilidad celular se ve aumentada. Este TFG busca poner a punto un protocolo para el establecimiento de dichos biofilms "in vitro" y, una vez establecido, poder usarlo como modelo para el estudio de moléculas que puedan alterarlo o destruirlo, lo que indicaría su posible uso como agentes de higiene bucal. Para ello, se han usado distintos métodos y tiempos de incubación, hasta determinar las condiciones adecuadas. Finalmente, el protocolo de incubación desarrollado se probó con diferentes compuestos antibacterianos.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, cariogénicos, biofilms, viabilidad celular, protocolo, agentes de higiene bucal.

Abstract and keywords

Streptococcus mutans bacteria are the primary cause of the main affliction of the oral cavity: cariogenic processes. Thanks to its ability to form dental biofilms (also known as dental plaque), this organism can persist in various infection sites, as cell viability is increased. This final degree project aims to develop a protocol for establishing these biofilms "in vitro" and, once established, use it as a model for studying molecules that can alter or destroy them, indicating their potential use as oral hygiene agents. Several methods and incubation times were used to determine the optimal conditions. Finally, the developed incubation protocol was tested with different antibacterial compounds.

Keywords: *Streptococcus mutans*, cariogenic, biofilms, cell viability, protocol, oral hygiene agents.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero darle las gracias a mi tutor, Manuel, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio y por haberme acompañado en cada paso.

Agradecerle también a mi familia su apoyo y ayuda incondicional durante todos estos años. Sin vosotros no habría llegado a donde estoy.

Agradecer a mi abuela Conchita su inagotable sabiduría para haberme ayudado a elegir mi profesión y haberme apoyado en mi decisión, al igual que me acompañó en mi camino durante tantos años.

A mis amigas, ya que sin su compañía este recorrido no habría sido lo mismo. Gracias por celebrar mis éxitos, apoyarme en las derrotas y estar incondicionalmente.

¡A todos, muchas gracias!



Contenido

1. Introducción	6
1.1. <i>Streptococcus mutans</i>	6
1.2. Biofilms y caries	7
2. Antecedentes y objetivos	8
3. Materiales y métodos	9
3.1. Cepa utilizada	9
3.2. Medios de cultivo y reactivos	9
3.3. Mantenimiento de la cepa <i>S. mutans</i> en colección	10
3.4. Crecimiento de la cepa <i>S. mutans</i>	10
3.5. Recuento de viables	11
3.6. Crecimiento de biofilm de <i>S. mutans</i>	11
3.7. Protocolos para el tratamiento de biofilms	12
3.7.1. Protocolo 1: Fijación usando formaldehído (Balhaddad <i>et al.</i> , 2021)	13
3.7.2. Protocolo 2: Biofilm no fijado (Hasibul <i>et al.</i> , 2017)	13
3.7.3. Protocolo 3: Secado del biofilm (Žiemytė <i>et al.</i> , 2021)	13
4. Resultados y discusión	14
4.1. Curva de crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i>	14
4.1.1. Recuento de viables	16
4.1.2. Establecimiento de biofilms según su densidad óptica	18
4.2. Comparación entre placas normales y placas tratadas con leche	20
4.3. Comparación entre placas normales y placas <i>coated</i> tratadas con antibióticos	21
4.4. Variación de la absorbancia en función del tiempo de conservación de la placa	23
4.5. Efecto del hipoclorito sódico sobre el biofilm	25
4.6. Comparación entre las variantes del Protocolo 3 (ácido acético e isopropanol)	26
4.7. Ensayo con biofilms tratados con etanol absoluto y etanol al 96%	29
4.8. Ensayo con el protocolo definitivo usando compuestos antimicrobianos	29
5. Conclusiones y proyección futura	30
6. Bibliografía	32

Índice de abreviaturas

QS, detección de quorum o *quorum sensing*.

BHI, medio *Brain Heart Infusion* (infusión de cerebro corazón) con 2% de sacarosa.

DO, densidad óptica.

O/N, tubo con la bacteria crecido durante toda la noche en estufa u *overnight*.



1. Introducción

1.1. *Streptococcus mutans*

En el año 1924, el científico James Kilian Clarke aisló una bacteria de una muestra tomada de una lesión de caries dental. La denominó *mutans* porque, debido a su forma ovalada (y no cocal, como es característico de los estreptococos), pensó que se debía tratar de una cepa mutante del género *Streptococcus*. En este estudio concluyó que esta bacteria predominaba en los estadios tempranos de la formación del biofilm dental (Clarke, 1924).

Streptococcus mutans es un organismo anaerobio facultativo, al igual que la gran mayoría de estreptococos, ácido tolerante y acidogénica (Abranches *et al.*, 2018). Se trata de una bacteria Gram positiva, que no posee flagelo, no es móvil y se dispone en cadenas (Figura 1). Además, como es un coco productor de ácido láctico, esta propiedad le permite bajar el pH de un medio neutro hasta un pH de 4.2 en tan solo 24 horas. Los diferentes serotipos de esta bacteria se han denominado c, e, f y k, y fueron clasificados en función a sus características inmunológicas, biológicas y genéticas. Cabe destacar que el tipo c es el serotipo mayoritario en la cavidad bucal humana, mientras que el k se destaca por su bajo nivel de cariogenicidad. Sin embargo, *S. mutans* no se considera solo un patógeno dental oportunista. También ha sido descrito como causante de bacteriemia, ya que por su baja antigenicidad es capaz de mantenerse durante mayor tiempo en el torrente sanguíneo, y se ha detectado con alta frecuencia como causante de endocarditis infecciosa (Ojeda-Garcés, 2013).



Figura 1. Imagen en microscopio electrónico de barrido de *Streptococcus mutans* (Matsumoto-Nakano, 2014).

No fue hasta finales de los años cincuenta que se empezó a indagar más sobre *S. mutans* y se descubrió que era determinante en la formación de caries. Se averiguó que la cavidad bucal era su hábitat natural y que se encontraba formando biofilms en la placa dental (Lemos *et al.*, 2019).

1.2. Biofilms y caries

En el biofilm, *S. mutans* presenta diversos factores de virulencia, como son la habilidad para sobrevivir en condiciones de pH realmente bajo y la capacidad de producir ácidos orgánicos a partir de carbohidratos comprendidos en la dieta (Li *et al.*, 2020). Aunque los biofilms causantes de las caries no tienen por qué estar compuestos exclusivamente por *S. mutans*, es cierto que esta presenta varias cualidades que la hacen predominar en estas formaciones y ser el microorganismo más contribuyente. Esta bacteria es capaz de colonizar la superficie dental mediante la síntesis de homopolímeros extracelulares de glucano, un polisacárido insoluble que le permite adherirse y acumularse, y puede producir varias bacteriocinas que le permiten matar otras bacterias patógenas que se encuentran en el biofilm (Priya *et al.*, 2023). Estos procesos de adaptación se dan gracias al *quorum sensing* (QS), un mecanismo intercelular de comunicación que se centra en la expresión de ciertos genes para una colonización del esmalte dental especialmente adaptada. Mediante esta comunicación se transfieren también pequeñas moléculas en respuesta al ambiente (diferentes señales químicas), lo cual les permite a las bacterias coordinar su comportamiento dentro del biofilm en función de la densidad poblacional (Alejandra & Daniel, 2020).

En condiciones anaeróbicas y situado en un biofilm bucal, *S. mutans* fermenta los carbohidratos para utilizarlos como su principal fuente de energía, dando como producto ácido láctico y ocasionando una bajada en el pH de la zona (Khan *et al.*, 2023). La formación de la caries es un proceso de avance y retroceso, de mineralización y desmineralización. La bajada de pH en el diente provocada por el ácido láctico, entre otros, provoca la desmineralización y una liberación de los iones fosfato del hidroxiapatito que conforman el esmalte (Figura 2). Sin embargo, compuestos como el flúor son capaces de revertir este proceso, ayudando con la remineralización (Priya *et al.*, 2023).

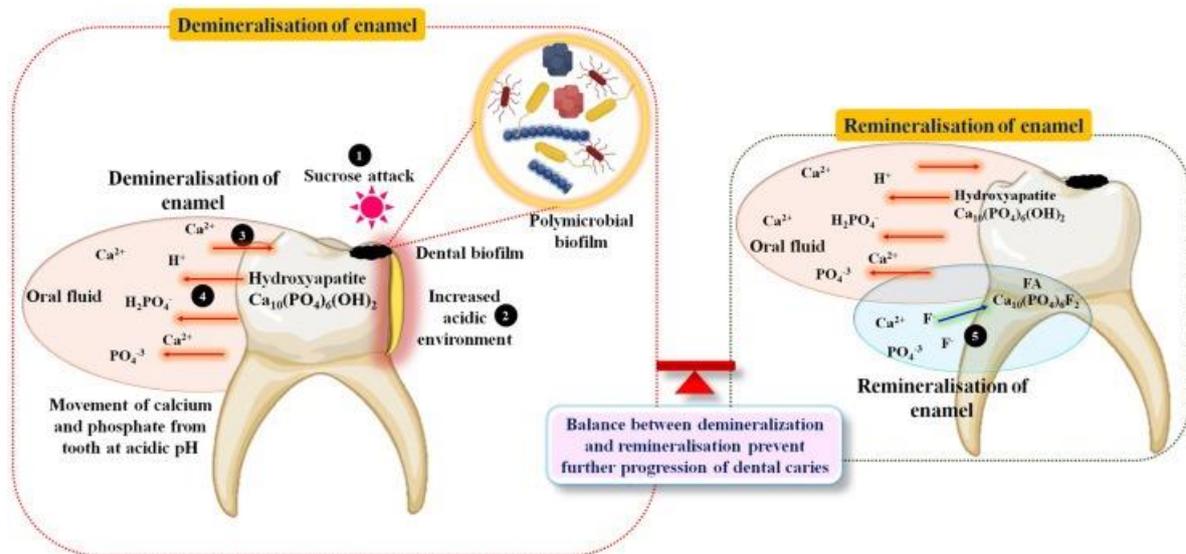


Figura 2. Desmineralización y remineralización en el proceso de erosión del diente

(Priya *et al.*, 2023).

Actualmente, la caries dental es una enfermedad afrontada desde la prevención mediante una salud bucodental apropiada. Para ello, se recomienda utilizar dentífrico fluorado dos veces al día, ya que es una práctica sencilla y por lo general dicho dentífrico es un producto accesible (OMS, 2022). Sin embargo, las afecciones bucodentales siguen siendo hoy en día un desafío para la salud pública. Según datos del año 2021, unos 2240 millones de personas presentan caries en dientes permanentes (GBD, 2021a) y 525 millones de personas las presentan en dientes de leche (GBD, 2021b).

2. Antecedentes y objetivos

Entender el proceso de formación de las caries y conocer los microorganismos causantes de estas ha sido un paso decisivo en el tratamiento de esta afección oral. *S. mutans* es el primer colonizador del esmalte dental, que abre camino a los posteriores microorganismos que causarán la placa.

Hoy en día, los estudios para el control de este patógeno bucal se centran en la inhibición de su crecimiento mediante el ataque a sus estructuras o mecanismos moleculares (siendo las dianas sus exopolisacáridos, distintas enzimas, etc.) usando compuestos experimentales. Otra perspectiva usada a la hora de inhibir el crecimiento de biofilms es la competencia con otros microorganismos también típicos de la cavidad bucal.

Sin embargo, es necesaria la optimización de un modelo de establecimiento de biofilms de *S. mutans* en laboratorio para entender mejor su funcionamiento biológico y evaluar la eficacia de las técnicas probadas. De esta forma, se simplifica el proceso de desarrollar métodos efectivos para combatir su colonización dental.

Por tanto, los objetivos de este TFG se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Desarrollar un modelo “in vitro” de establecimiento de biofilms de *Streptococcus mutans*, con el fin de que sea fiable para reproducir en un entorno controlado de laboratorio.
- Medir la viabilidad celular de dichos biofilms mediante conteo en placa y lectura de absorbancia.
- Observar los efectos producidos en los biofilms por compuestos con poder antimicrobiano como hipoclorito sódico (también conocido como lejía), ampicilina, kanamicina, proadifen, atropina y promazina.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepa utilizada

La cepa utilizada para realizar este proyecto fue *Streptococcus mutans* CECT 479, obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo. Esta cepa se considera de nivel de seguridad 1 (BSL-1). Toda manipulación de esta cepa se realizó en laboratorio con material estéril y en condiciones asépticas, con mechero Bunsen o mediante una campana de cultivo, para evitar posibles contaminaciones.

3.2. Medios de cultivo y reactivos

Para el crecimiento del microorganismo en medio líquido se preparó medio BHI (*Brain Heart Infusion*) con 2% de sacarosa, que proveía las condiciones necesarias y que contenía BHI en concentración 37 g/L y sacarosa en concentración 20 g/L.

Para el recuento de viables en medio sólido se utilizaron placas de medio Agar Sangre de la marca comercial Bioagar. También se utilizaron placas de medio sólido BHI preparado en el laboratorio, ya que se vio que su crecimiento en este era igual de bueno tanto en medio líquido como en sólido. Estas placas se prepararon con BHI en

concentración 37 g/L, sacarosa a 20 g/L y agar en concentración 15 g/L. Por tanto, en estas últimas placas el porcentaje final de agar fue de 1,5%.

Todos estos medios de cultivo y materiales usados fueron esterilizados en autoclave a 1,2 atmósferas de vapor y a 121 °C durante 20 minutos. Tras haberse atemperado, los medios de cultivo se almacenaban en nevera a 4 °C.

En este trabajo, los biofilms se trataron con diferentes compuestos. Entre ellos, con leche desnatada de grado microbiológico, esterilizada y de la marca Merck (Ref. 15363) y con determinados antibióticos como ampicilina y kanamicina, ya que el efecto de esta última sobre *S. mutans* ha sido evaluado en estudios previos (Little *et al.*, 1979).

3.3. Mantenimiento de la cepa *S. mutans* en colección

La cepa se encontraba congelada a -80 °C para su correcta conservación. Tras su descongelación, se realizó una siembra en una placa de agar sangre y se dejó incubando. Tras comprobar que creció correctamente, esta fue la placa designada para realizar los experimentos. Para estos, se obtenía una muestra de *S. mutans* directamente de la placa y se introducía en 4 mL de medio líquido BHI.

3.4. Crecimiento de la cepa *S. mutans*

Para el crecimiento de *S. mutans*, que alcanza un máximo de densidad óptica a 600 nanómetros (DO₆₀₀) alrededor de 1,4 tras crecer 24 horas, se preparaba el inóculo el día anterior (cultivo *overnight* O/N). Para dicho inóculo, se utilizaba un tubo estéril SARSTEDT de 5 mL (Ref. 55.475.001) con un volumen de 4 mL de medio BHI. Este tubo se inoculaba con una muestra tomada con asa de siembra de la placa de Agar Sangre de *S. mutans* conservada en nevera. Adicionalmente se preparaba otro tubo estéril con la misma cantidad de BHI, pero sin inocular como control de contaminación. Estos dos tubos se dejaban en la estufa durante toda la noche a 37 °C.

Para los experimentos realizados siguiendo la curva de crecimiento, se inoculaban 30 µL del tubo O/N en otro tubo de 4 mL con medio estéril BHI precalentado y se incubaba en el baño termostático a 37 °C hasta que transcurriese una hora. En este momento se realizaba la primera medida de absorbancia y se devolvía al baño para posteriormente seguir realizando medidas de absorbancia cada 20 minutos hasta llegar a una DO₆₀₀ de 1,4. Como control se usó un tubo conteniendo medio BHI estéril que se utilizó como blanco durante las medidas de la curva de crecimiento.

Para monitorizar el crecimiento de la bacteria se medía la densidad óptica del cultivo líquido usando un espectrofotómetro Zuzi modelo 4201/50. Los tubos de ensayo estériles utilizados, mencionados previamente, presentaban un paso óptico de 1 cm. Esto permitía medir directamente la densidad óptica del cultivo en el tubo de ensayo, tomando las muestras a densidad óptica de 600nm.

3.5. Recuento de viables

Para el recuento de viables las muestras a estudio fueron tomadas a 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 y 1,4 de DO_{600} . Sin embargo, como la cantidad de bacteria en el cultivo era muy elevado, se realizó un banco de diluciones. Para la primera dilución se introdujo 10 μ L de muestra junto con 90 μ L de medio BHI. En la siguiente dilución, que también contaba con 90 μ L de medio BHI, se le incorporaron 10 μ L de la dilución anterior. Así, se realizaron diluciones de la muestra original hasta alcanzar el factor de dilución 10^{12} .

El primer experimento de recuento de viables se realizó en placas de medio sólido de Agar Sangre. Para este medio, se colocó una gota de 10 μ L de la dilución 10^4 hasta la 10^{12} . Este procedimiento se repitió dos veces para cada densidad óptica con el fin de tener duplicados de este recuento.

El siguiente experimento de recuento de viables se realizó en placas de medio sólido de BHI. El procedimiento seguido fue el mismo, con la mínima diferencia de que las gotas depositadas en la placa fueron de 5 μ L.

3.6. Crecimiento de biofilm de *S. mutans*

Para los experimentos de establecimiento de biofilm en placas de 96 pocillos, se utilizaba un cultivo O/N que se diluía de forma que la concentración para inocular los pocillos fuese de 0,05 unidades DO_{600}/mL (Álex Mira, comunicación personal). Con esta preparación homogénea se inoculaban todos los pocillos.

En este proyecto se utilizaron dos tipos de placas de 96 pocillos. El primer tipo de placa utilizada es de la marca SARSTEDT (Ref. 83.3924.005) para el cultivo celular de líneas animales. El segundo tipo de placa utilizada es de la marca NEST (Ref. 713011) y denominada *coated* (es decir, tratada para que las células animales puedan adherirse mejor).

En estas placas se realizó la inoculación para el crecimiento de los biofilms y su posterior tratamiento de tinción con cristal violeta (Figura 3):

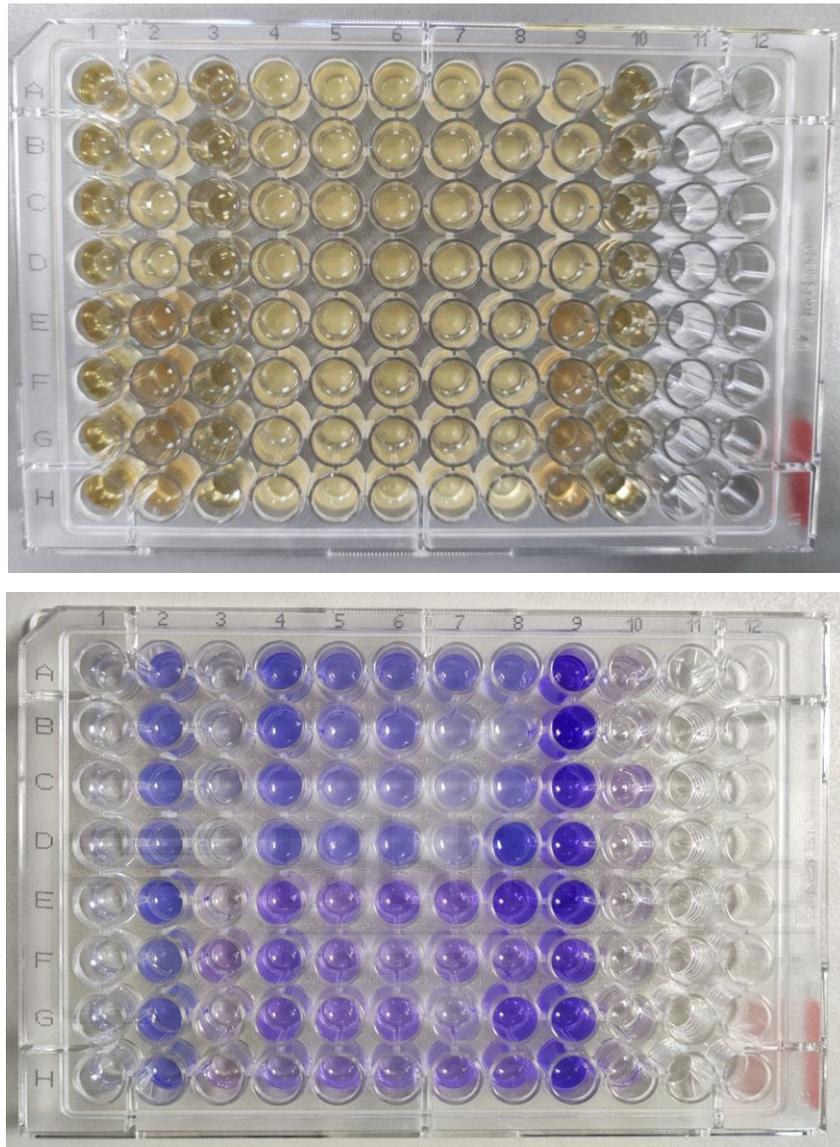


Figura 3. En la parte superior se muestra una placa en la que se ha permitido el crecimiento de diferentes biofilms de *S. mutans* bajo diferentes condiciones. En la parte inferior se muestra la misma placa una vez tratada y teñida con cristal violeta. La columna de la izquierda es la columna control sin biofilms.

3.7. Protocolos para el tratamiento de biofilms

Es necesario destacar que en la actualidad existen numerosos protocolos en los que se utilizan biofilms de *Streptococcus mutans*. Como se ha indicado antes, el objetivo de este trabajo era establecer un protocolo que pudiera ser usado de manera rutinaria en las instalaciones de las que disponemos en nuestra universidad. Por lo que se utilizaron distintos tratamientos y protocolos obtenidos de distintas fuentes con el fin de encontrar aquel que proporcionase una lectura más fiable y eficaz. En todos los protocolos

examinados se utiliza Cristal Violeta para la tinción del biofilm, pero una diferencia fundamental es que cada uno de ellos utiliza un compuesto orgánico distinto para disolver dicho colorante y luego medir la absorbancia.

3.7.1. Protocolo 1: Fijación usando formaldehído (Balhaddad *et al.*, 2021)

1. Eliminar sobrenadante del pocillo.
2. Añadir 200 μ L de formaldehído al 10%.
3. Dejar 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar el formaldehído y lavar 3 veces con 200 μ L de agua.
5. Añadir 200 μ L de cristal violeta al 0,5%.
6. Dejar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retirar el colorante y lavar 3 veces con 200 μ L de agua.
8. Añadir 200 μ L de isopropanol para lisar las células.
9. Dejar 1 hora a temperatura ambiente. Se puede almacenar en nevera.
10. Leer la placa a 490 nanómetros.

3.7.2. Protocolo 2: Biofilm no fijado (Hasibul *et al.*, 2017)

1. Eliminar sobrenadante del pocillo.
2. Lavar 3 veces con 200 μ L de PBS.
3. Añadir 100 μ L de cristal violeta al 0,01%.
4. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar 4 veces con 200 μ L de PBS.
6. Añadir 200 μ L de ácido acético 33%.
7. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.
8. Leer la placa a 550 nanómetros.

3.7.3. Protocolo 3: Secado del biofilm (Žiemytė *et al.*, 2021)

Este protocolo se adquirió del laboratorio del Dr. Álex Mira en el FISABIO, con gran experiencia en el desarrollo de biofilms orales. Este protocolo fue el que mejor resultado dio y sobre el cual se realizaron variaciones para su optimización en nuestras condiciones. El protocolo con sus **variaciones** se muestra a continuación:

1. Recoger sobrenadante.
2. Lavar con 200 μ L de PBS.

3. Añadir 200 μ L de cristal violeta al 0,2% y dejar durante 30 minutos.
4. Retirar el cristal violeta.
5. Lavar 2 veces con 200 μ L de PBS.
6. Dejar secar 24 horas a temperatura ambiente o 90 minutos en estufa.
7. Compuestos con los que se experimentó para disolver el biofilm y realizar la lectura de absorbancia:
 - 7.1. **Isopropanol:** Añadir 200 μ L de isopropanol y leer a 490 nanómetros.
 - 7.2. **Ácido acético:** Añadir 200 μ L de ácido acético al 30% y leer a 600 nanómetros.

4. Resultados y discusión

Primero, se realizaron unos ensayos donde se realizaba una curva de crecimiento monitorizada por los cambios en la densidad óptica. Gracias a esta curva se realizó el recuento de viables en medio sólido y se inoculó una placa por intervalos de DO (que sería posteriormente tratada con uno de los protocolos previamente mencionados). Posteriormente, se realizaron una serie de ensayos donde la inoculación en las placas de pocillos se realizaba de forma homogénea (haciendo que todos los pocillos presentasen la misma DO antes de su incubación en estufa) y se trataron con el Protocolo 3 con la finalidad de encontrar el mejor compuesto para la disolución del biofilm. Por último, cuando se consiguió este objetivo de encontrar el mejor modelo de establecimiento, se probó el protocolo con distintos compuestos antimicrobianos.

4.1. Curva de crecimiento de *Streptococcus mutans*

Este experimento se realizó con el fin de comprender mejor el crecimiento y desarrollo de la bacteria. Las gráficas obtenidas fueron las siguientes:

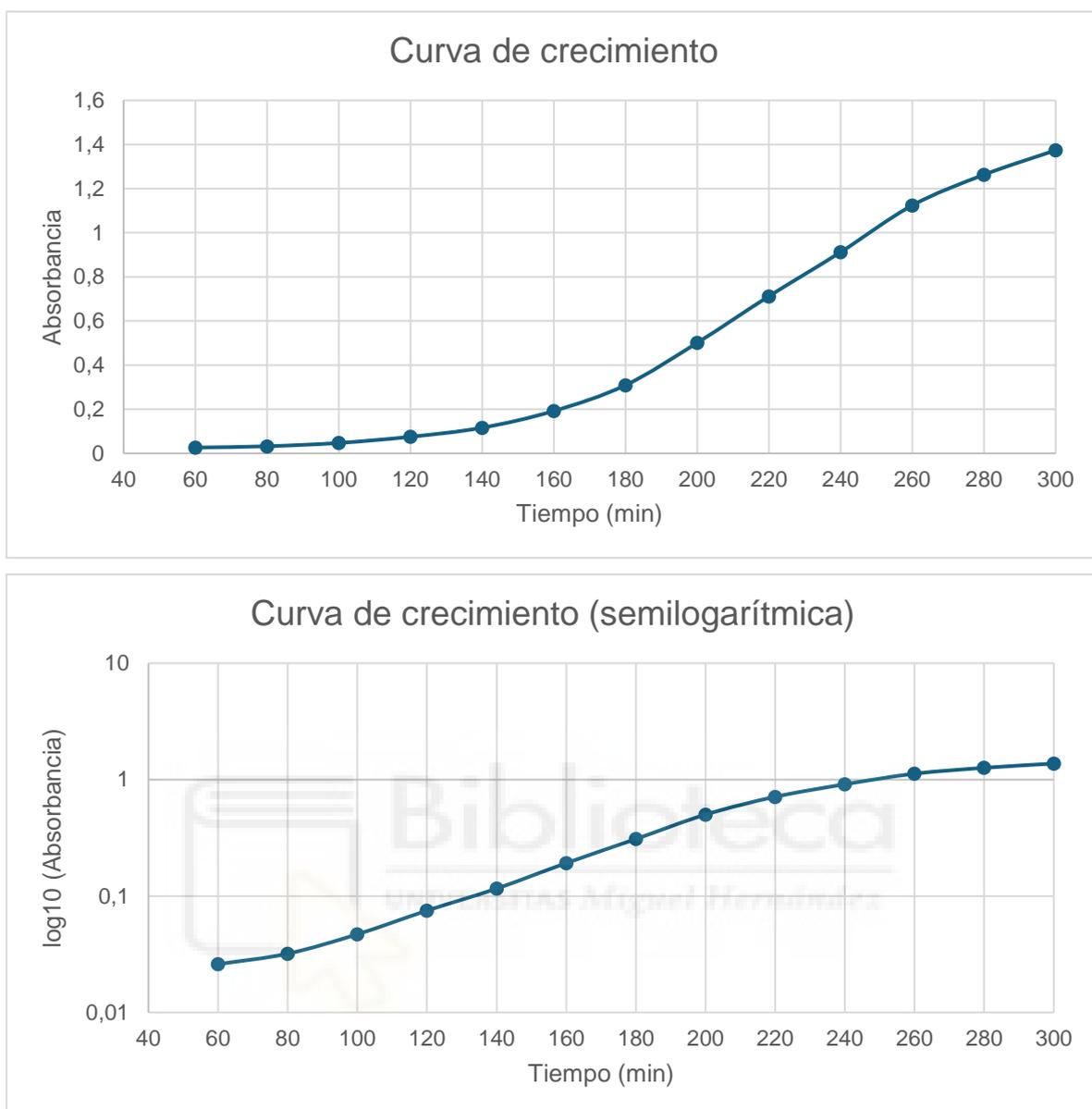


Figura 4. Representación de la curva de crecimiento de *Streptococcus mutans* en escala lineal (imagen superior) y representación de la misma curva en escala semilogarítmica (imagen inferior).

Como se puede ver en las gráficas (Figura 4), el crecimiento exponencial se observa entre el intervalo de 80 y 220 minutos ya que viene definido por el segmento recto en la representación semilogarítmica. A partir de los 220 minutos el cultivo comienza a entrar en fase estacionaria y el máximo de absorbancia se alcanza alrededor de 1,4 unidades de DO_{600} . Con estos datos se calculó que el tiempo de generación del cultivo era de 29 minutos. Las muestras de bacteria para inocular las placas de 96 pocillos y el recuento de viables se tomaron en los puntos de absorbancia 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 ya que el cultivo está en crecimiento exponencial. Además, también se realizaron biofilms a partir del cultivo O/N para comparar.

4.1.1. Recuento de viables

En este ensayo se realizó un recuento de viables en placas de medio sólido BHI y agar sangre. Se tomaron muestras de los puntos cuando el cultivo alcanzó las DO_{600} antes indicadas y se realizaron distintas diluciones, de donde se extrajeron gotas de $5 \mu\text{L}$ para depositar en la placa de BHI y gotas de $10 \mu\text{L}$ para las placas de agar sangre. En cada placa de densidad óptica se hicieron dos copias de este ensayo, por lo que se depositaron dichas gotas desde la dilución 10^4 hasta la dilución 10^{12} por duplicado (Figura 5). Para el recuento de viables únicamente se contaron las gotas que contenían desde 10 hasta 100 unidades formadoras de colonias aproximadamente.

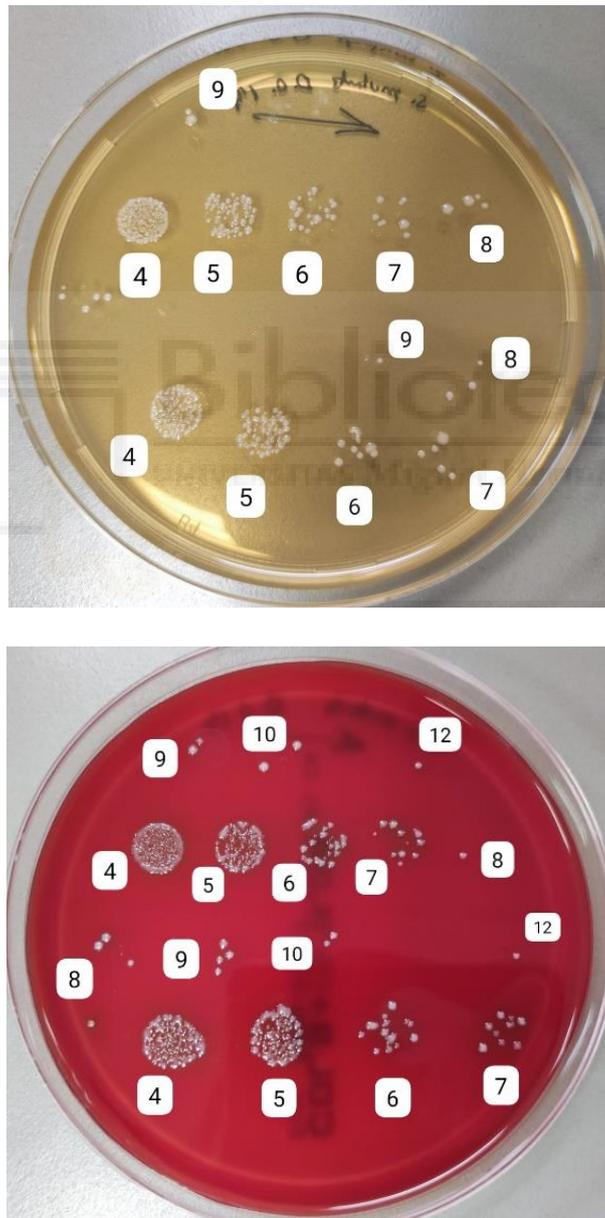


Figura 5. Placa de medio BHI (imagen superior) y medio agar sangre (imagen inferior) donde se muestra la distribución de las gotas según el exponente de su dilución para el recuento de viables de densidad óptica 1,4.

El número de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) obtenidas según la densidad óptica se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Correlación entre valores de DO_{600} y número de viables.

DENSIDAD ÓPTICA	UFC/mL
0,1	$1,19 \cdot 10^8$
0,2	$1,47 \cdot 10^8$
0,4	$7,36 \cdot 10^8$
0,8	$3,30 \cdot 10^9$
(CULTIVO O/N) 1,4	$1,39 \cdot 10^9$

Por tanto, gracias a los resultados obtenidos se construyó la siguiente gráfica, que representa la presencia bacteriana activa en cada estadio de crecimiento de la bacteria. Estos valores se representan a continuación en la figura 6:

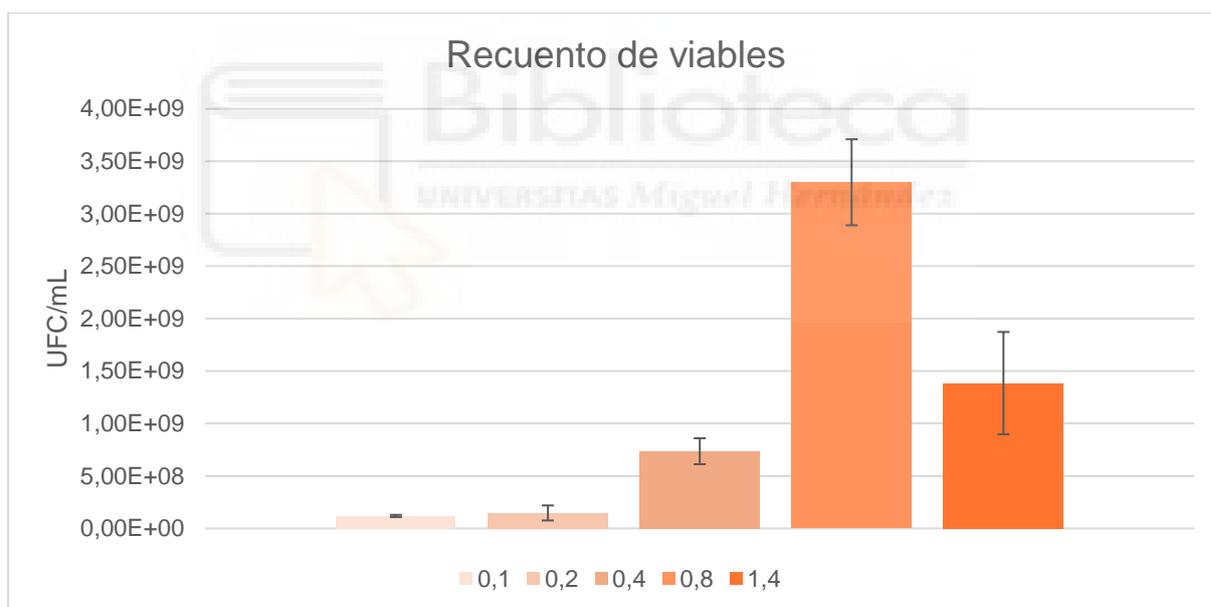


Figura 6. Unidades formadoras de colonias contenidas en un mililitro de cultivo en función de su densidad óptica.

Cabe destacar que el recuento de densidad óptica a 1,4 se realizó con el cultivo O/N y podemos ver que el número de viables ha disminuido significativamente, lo que indica que dicho cultivo ya estaba en fase de muerte. Sin embargo, se puede observar que no es el caso del cultivo de densidad óptica 0,8: aquí el número de bacterias vivas alcanza un pico ya que se encuentra en su fase de crecimiento exponencial, por lo que es lógico

encontrar un número mucho mayor de unidades formadoras de colonias activas en el medio.

4.1.2. Establecimiento de biofilms según su densidad óptica.

Para establecer los biofilms en las placas de 96 pocillos se inoculaban cuatro pocillos de cada densidad óptica, además de incluir cuatro pocillos que únicamente contenían medio sin inocular con el fin de que este fuese el control negativo. Esta placa se dejaba a 37 °C durante 24 horas para su crecimiento.

Transcurrido este tiempo, la placa fue tratada con el protocolo 1, en el que fijábamos con formaldehído las células antes de teñirlas con cristal violeta. Posteriormente fue leído a tres longitudes de onda distintas: 490, 550 y 570 nanómetros. Se midió en estas tres longitudes de onda debido a que 490 nm es la más adecuada cuando se usa el isopropanol (Balhaddad *et al.*, 2021), 550 nm es para el ácido acético 33% (Hasibul *et al.*, 2017) y 570 nm es la del etanol (Consuelo Ferrer, comunicación personal). Las absorbancias obtenidas fueron las siguientes:



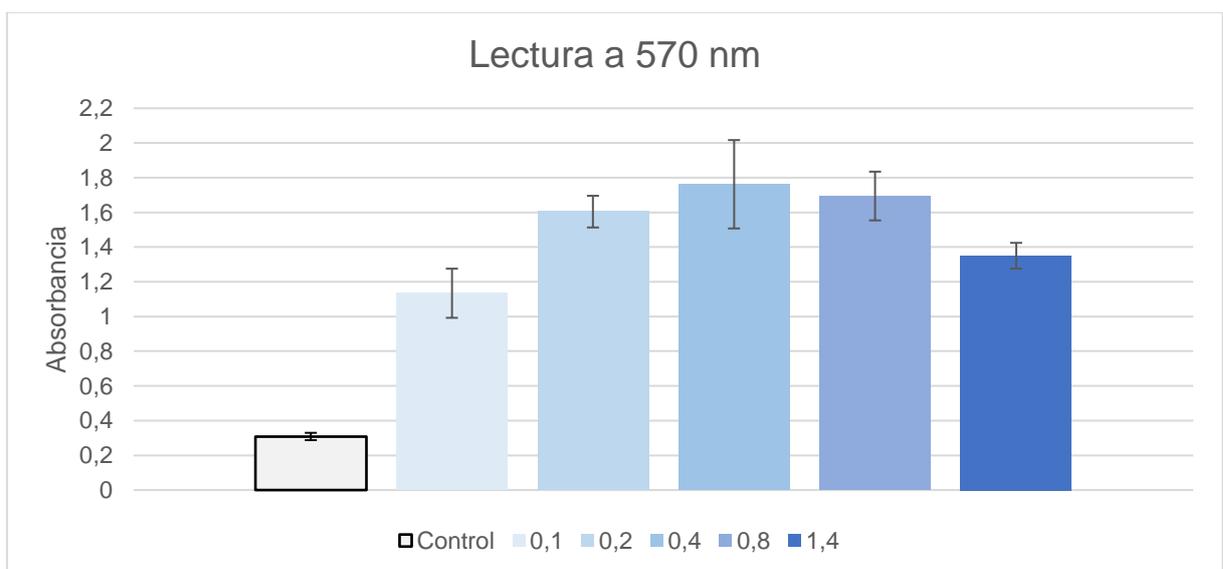
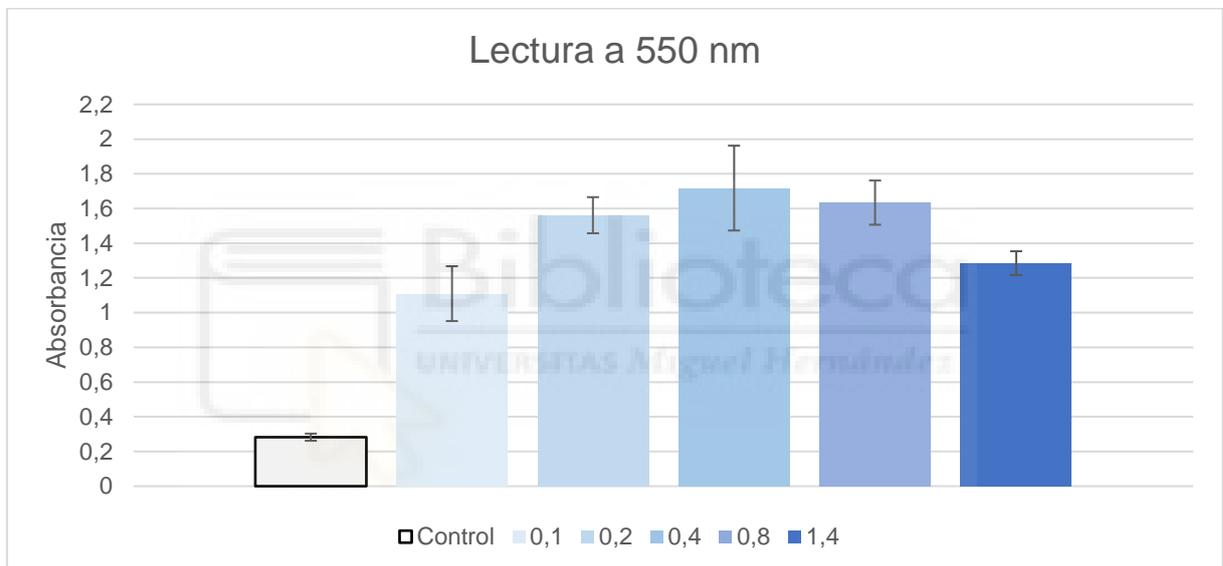
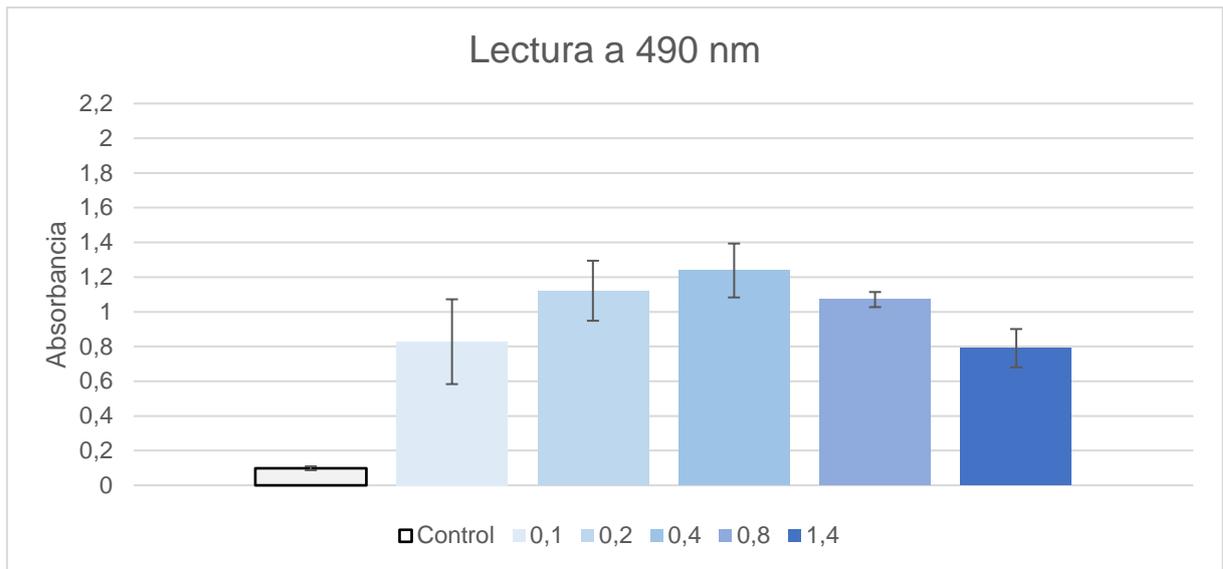


Figura 7. Absorbancias del biofilm a 490, 550 y 570 nanómetros.

Como se puede observar en la figura 7, se obtuvo menor absorbancia en la lectura de 490 nanómetros, mientras que a 550 y 570 se obtuvieron valores más parecidos (probablemente debido a la mayor cercanía en el espectro de longitudes de onda). Además, en la gráfica de lectura a 490 nanómetros se puede observar que en esta longitud de onda la absorbancia de fondo es menor que en los otros dos casos. Por otro lado, cabe destacar que, si bien la densidad del biofilm va en escala ascendente desde 0,1 hasta 0,4, parece que a partir de 0,8 la densidad disminuye. Aunque aparentemente y a simple vista los biofilms eran idénticos entre sí tras la incubación, sí es cierto que el inóculo con el que se realizó cada prueba es importante, ya que influye en el desarrollo del biofilm.

4.2. Comparación entre placas normales y placas tratadas con leche

En este apartado se quiso analizar si la adición de leche desnatada en los pocillos podía tener algún efecto sobre el desarrollo del biofilm. Se comprobó si este compuesto podía aumentar la adhesión, ya que contiene lactosa y proteínas, nutrientes que pueden ser usados por *S. mutans* y por lo cual podría contribuir a la formación de un biofilm mejor establecido en el fondo del pocillo.

Para llevar a cabo este experimento, los pocillos que contenían leche se trataron a dos tiempos distintos. Las gotas de leche de 10 μ L (concentración final 0,05%) se añadieron una hora y veinticuatro horas antes de la inoculación. Para el tratamiento se utilizó el Protocolo 3 – Ácido acético y el Protocolo 2. Sin embargo, como los resultados con el Protocolo 2 no fueron concluyentes, se decidió no seguir utilizando este protocolo. Los resultados tras leer a 600 nm se muestran en la figura 8:

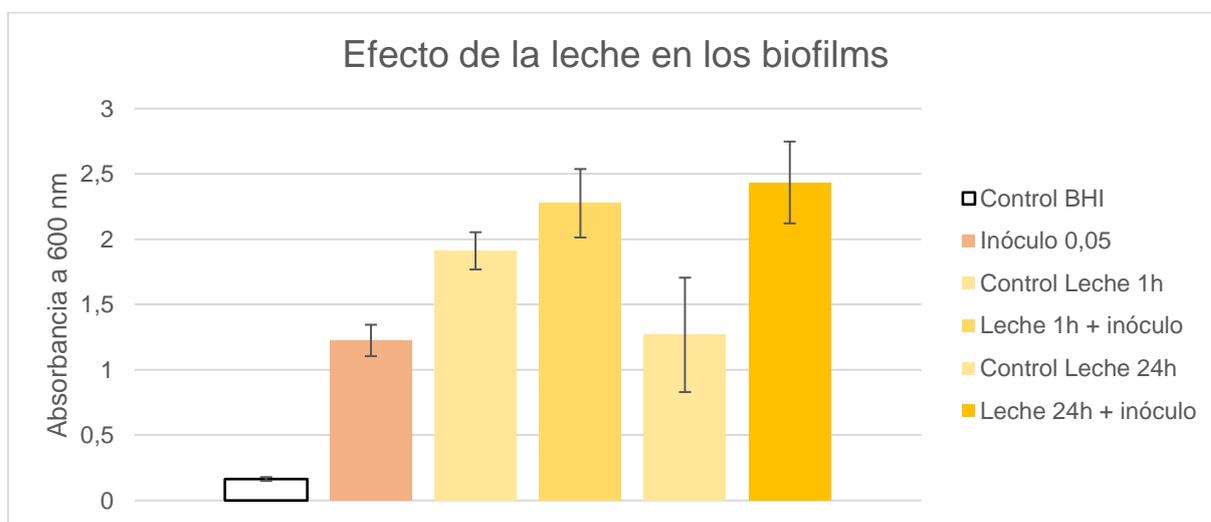


Figura 8. Efecto de la leche sobre el biofilm a distintos tiempos.

Respecto a la absorbancia de los pocillos control tratados con leche, se puede ver que, aunque el control de una hora presenta una absorbancia alta, esto no sucede así en el control de veinticuatro horas. Esto probablemente se debe a que la leche, depositada en el fondo del pocillo una hora antes, lo oscureció, provocando un aumento de la absorbancia relevante a la hora de entender los resultados. Sin embargo, en el caso de los pocillos donde se había depositado la gota de leche hacía veinticuatro horas, ésta ya estaba seca y no provocó un aumento tan notable en la absorbancia. Otra conclusión relevante extraída es que, si bien los pocillos tratados con leche presentaron una absorbancia parecida entre sí pese a la diferencia temporal, esta absorbancia fue superior a la obtenida en los biofilms que no fueron tratados con leche desnatada. Debido a la alta absorbancia del control con leche sin cultivo se decidió no continuar con este procedimiento para el establecimiento de biofilms.

4.3. Comparación entre placas normales y placas *coated* tratadas con antibióticos

Los resultados anteriormente descritos muestran que los biofilms de *S. mutans* pueden establecerse tanto a partir de un cultivo O/N como de un cultivo exponencial. Utilizando el primer protocolo se hace mucho más sencillo. Además, tal y como se describe en el Protocolo 3, se puede usar directamente un cultivo O/N si se le diluye suficientemente hasta 0,05 DO₆₀₀ por mililitro para que crezca de manera exponencial durante su incubación a 37 °C. Cada pocillo fue inoculado con 200 microlitros de dicho cultivo diluido como forma de establecer biofilms de manera rutinaria.

En este ensayo se quiso comprobar la afinidad de los biofilms por un tipo de plástico u otro utilizando las placas normales de la marca SARSTEDT y placas tratadas (*coated*) de la marca NEST, que permiten una mejor adherencia a las células eucariotas, para las que están diseñadas. Además, se puso también a prueba la resistencia de los biofilms a dos antibióticos, ampicilina y kanamicina (concentración final 1 mM), añadidos en el momento de la inoculación del pocillo (tiempo cero) y a las cuatro y veinticuatro horas de la inoculación.

Los resultados obtenidos tras tratar los pocillos con el Protocolo 3 – Ácido acético y leer a 600 nm fueron los siguientes:

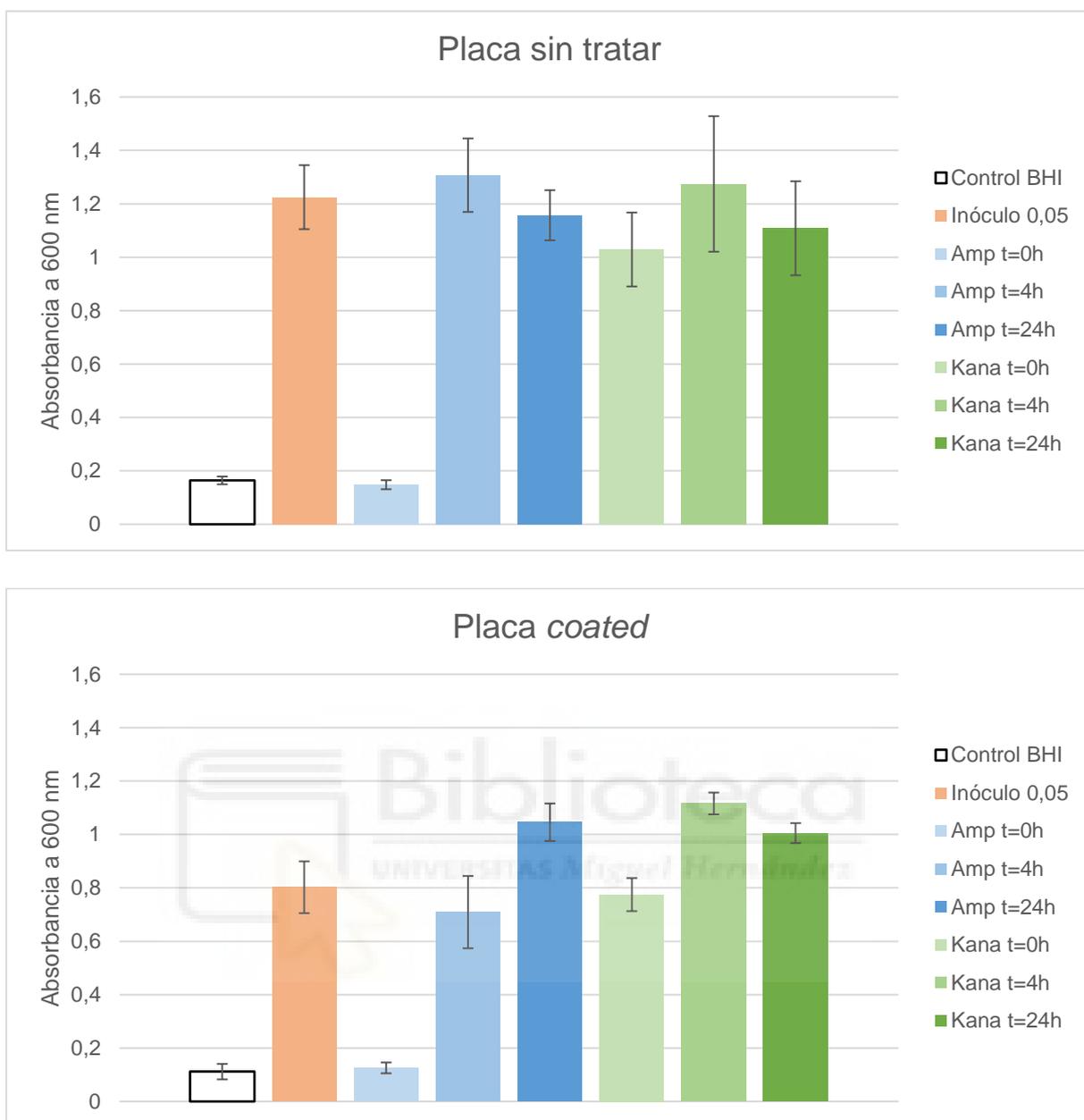


Figura 9. Efecto de los antibióticos en la placa normal (superior) y en la placa *coated* (inferior).

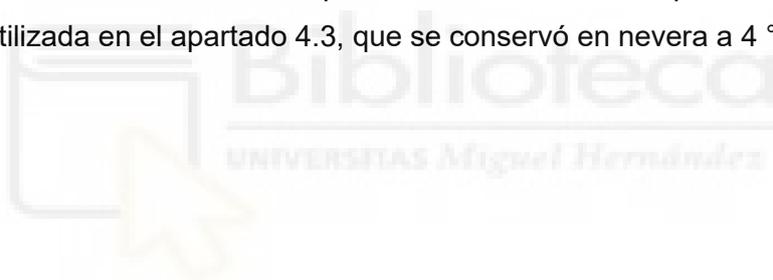
Como primera conclusión extraída de este ensayo, se puede ver que el crecimiento de biofilms en la placa normal no tratada fue más exitoso: las absorbancias obtenidas en la placa normal superan con creces a las obtenidas en la placa *coated* (ver Figura 9), por lo que para el resto de este trabajo se decidió seguir usando dicho tipo de placas.

En cuanto a los efectos de los antibióticos sobre los biofilms, se puede observar que el único cambio apreciado en la absorbancia se da en el caso de la adición de ampicilina a tiempo cero. Por tanto, podemos deducir que el biofilm sólo es sensible a este antibiótico en ese momento del crecimiento. Sin embargo, un detalle a destacar es que cuando tan solo habían transcurrido cuatro horas de la inoculación, el biofilm de los

pocillos tratados con kanamicina a tiempo cero todavía no se había desarrollado (lo que explica la menor absorbancia en estos pocillos). Esto indica una cierta sensibilidad a este antibiótico que no consigue impedir la creación del biofilm de la bacteria (ya que como se puede observar en la columna de kanamicina a tiempo cuatro y veinticuatro horas, hay una absorbancia elevada). Cabe destacar que el antibiótico añadido a tiempo veinticuatro horas se dejó actuar durante dos horas antes de realizar el tratamiento con el Protocolo 3 para la lectura. Aunque en este caso ($t = 24$ h) la bajada en la absorbancia es poco apreciable, durante el tratamiento sí se percibió una pérdida de adherencia del biofilm debido a la actuación del antibiótico, aunque dicha pérdida no pudo ser cuantificada.

4.4. Variación de la absorbancia en función del tiempo de conservación de la placa

Para este ensayo se comparó la absorbancia de una placa el día del experimento y 5 días después de este. Se utilizó la placa sin tratamiento de plástico de la marca SARSTEDT utilizada en el apartado 4.3, que se conservó en nevera a 4 °C.



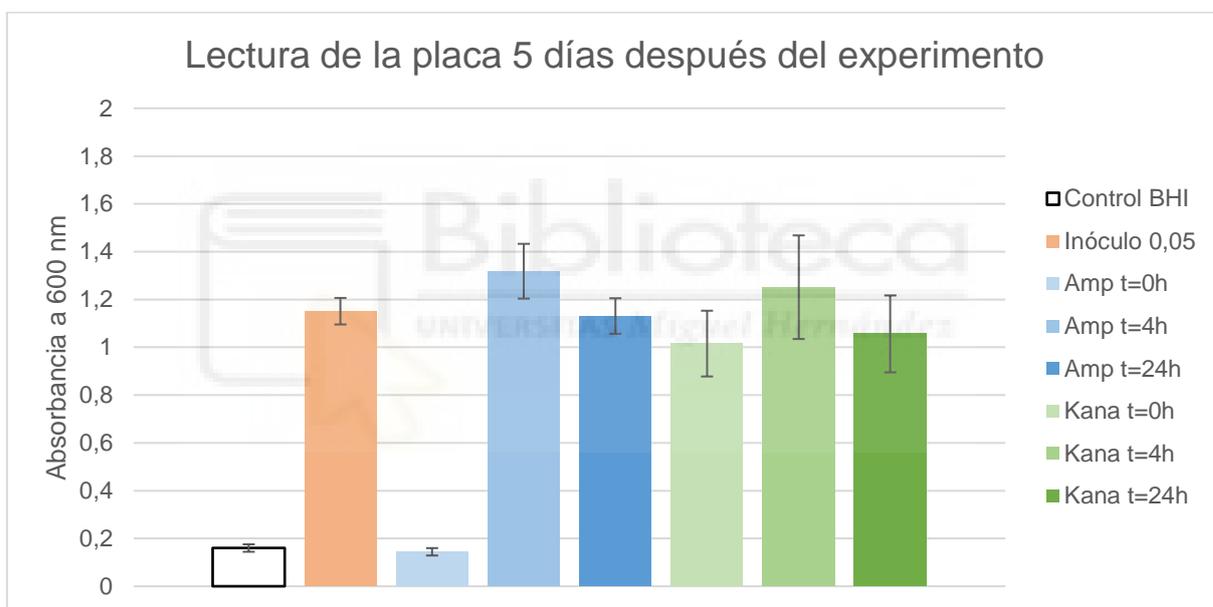
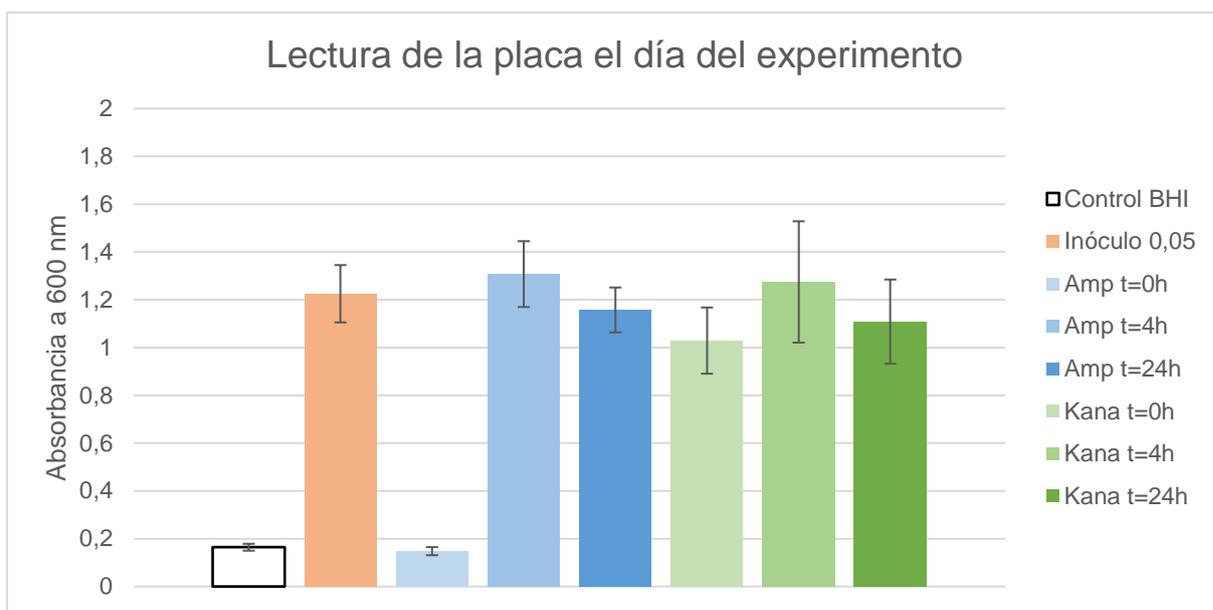


Figura 10. Comparación de absorbancia de una placa normal el mismo día del experimento (superior) y tras cinco días de conservación en nevera (inferior).

Como se puede observar en las gráficas (Figura 10), estas son prácticamente idénticas. Esto sucedió en todos los pocillos de la placa. Por tanto, se concluyó que en las placas tratadas con el Protocolo 3 – Ácido acético para su lectura, el tiempo de conservación en nevera podía llegar a ser hasta de 5 días. Este tipo de información es útil a la hora de saber cuánto tiempo se puede esperar para la lectura de los resultados sin que estos se vean afectados.

4.5. Efecto del hipoclorito sódico sobre el biofilm

En este experimento se probó la resistencia del biofilm al hipoclorito sódico (lejía) utilizando dos tratamientos distintos. Para la primera prueba, se probó a incorporar 20 μL de hipoclorito sódico al 5% (concentración final 0,5%) a las cuatro horas de la inoculación de los pocillos con la bacteria. Para la segunda prueba se probó un tratamiento distinto, realizándolo a tiempo cero, a las cuatro horas y a las veinticuatro horas de la inoculación. Para el experimento a tiempo cero se añadió 40 μL de hipoclorito sódico al 5% (concentración final 1%). Sin embargo, para los experimentos a tiempo cuatro y veinticuatro horas se vació el pocillo de su contenido en BHI sin afectar al biofilm, para luego introducir 200 μL de hipoclorito sódico y dejarlo actuar durante 10 minutos. Tras esto, se retiraba con cuidado el hipoclorito y se volvía a rellenar el pocillo con medio BHI. Los resultados de absorbancia tras tratar con el Protocolo 3 – Isopropanol y leer a 490 nm se muestran en la figura 11:

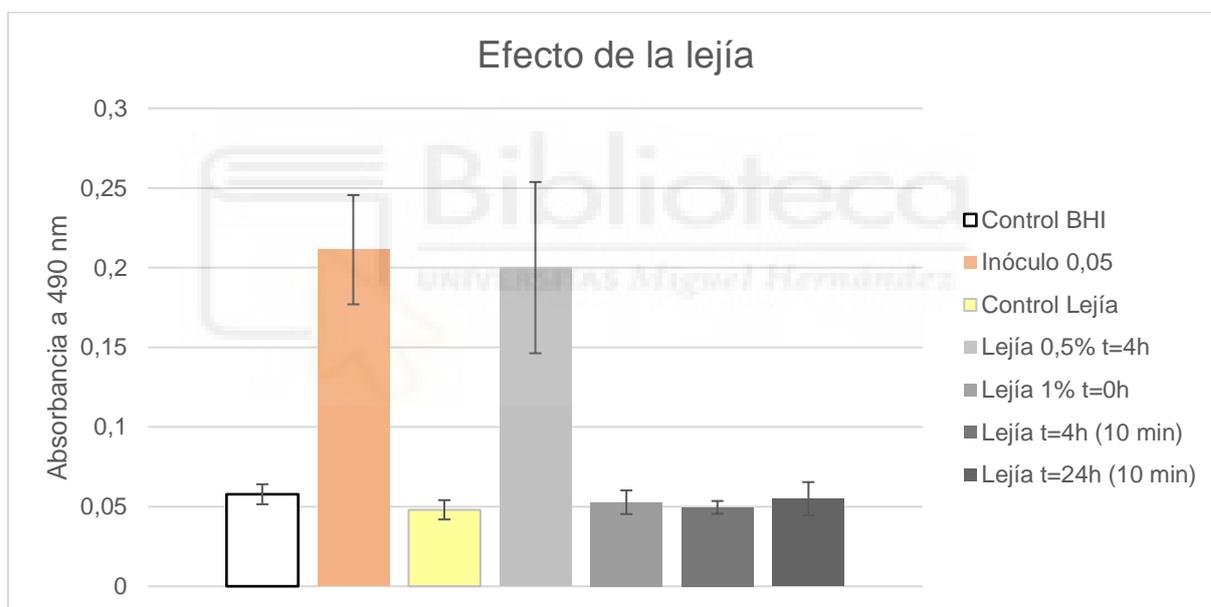


Figura 11. Efecto del hipoclorito sódico a distintas concentraciones y distintos tiempos.

Por un lado, respecto a la absorbancia obtenida de los pocillos tratados con lejía 0,5% a tiempo cuatro horas, cabe destacar que el biofilm resistió y no mostró sensibilidad ni peor adherencia. Este resultado se debe a la baja concentración de lejía utilizada y el momento en el que se administró (ya que el biofilm ya estaba establecido), que no consiguió ralentizar o afectar al crecimiento. Por otro lado, podemos ver que no sucedió así al administrar este compuesto a tiempo cero y a concentración 1%, ya que al ser una concentración mayor y al administrarlo en el momento de la inoculación, la bacteria no consiguió formar un biofilm. Lo mismo pasa al tratar los pocillos con 200 μL de hipoclorito sódico durante diez minutos a tiempo cuatro y veinticuatro horas. Este

resultado confirma que la acción del hipoclorito al 5% es capaz de destruir un biofilm ya establecido.

4.6. Comparación entre las variantes del Protocolo 3 (ácido acético e isopropanol).

En este ensayo se trataron los biofilms con las dos variantes del Protocolo 3, para comprobar con cuál de los dos componentes se obtenía un mejor resultado de lectura. Además, otro aspecto en el que este experimento difiere es el tiempo de aplicación del antibiótico administrado al biofilm que, en vez de ser tratado a las veinticuatro horas, fue tratado a las cuarenta y ocho horas. Este antibiótico se dejó actuar durante una hora.

Es importante destacar que los resultados obtenidos se leyeron a 490 y 600 nanómetros, ya que, como se ha comentado anteriormente, estas son las longitudes de onda para la lectura del isopropanol y ácido acético, respectivamente. Sin embargo, al realizar la medida a 600 nm se observó que los valores saturaban el lector, por lo que se tuvo que diluir el contenido de estos en 1:3 para su correcta lectura (Figura 12).

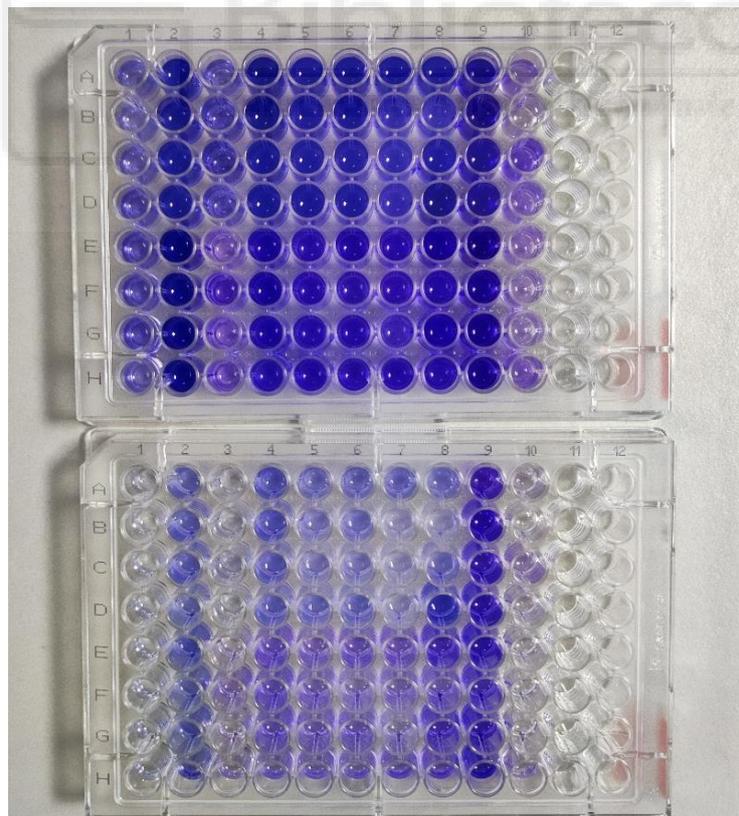


Figura 12. Placa sin diluir (arriba) versus placa diluida 1:3 (abajo).

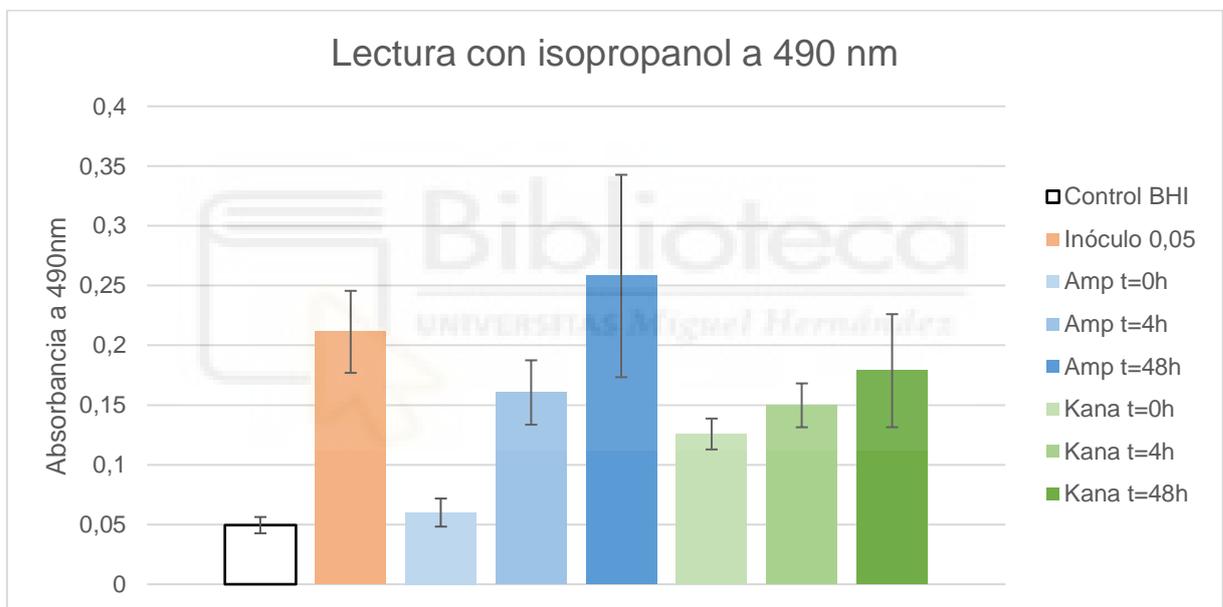
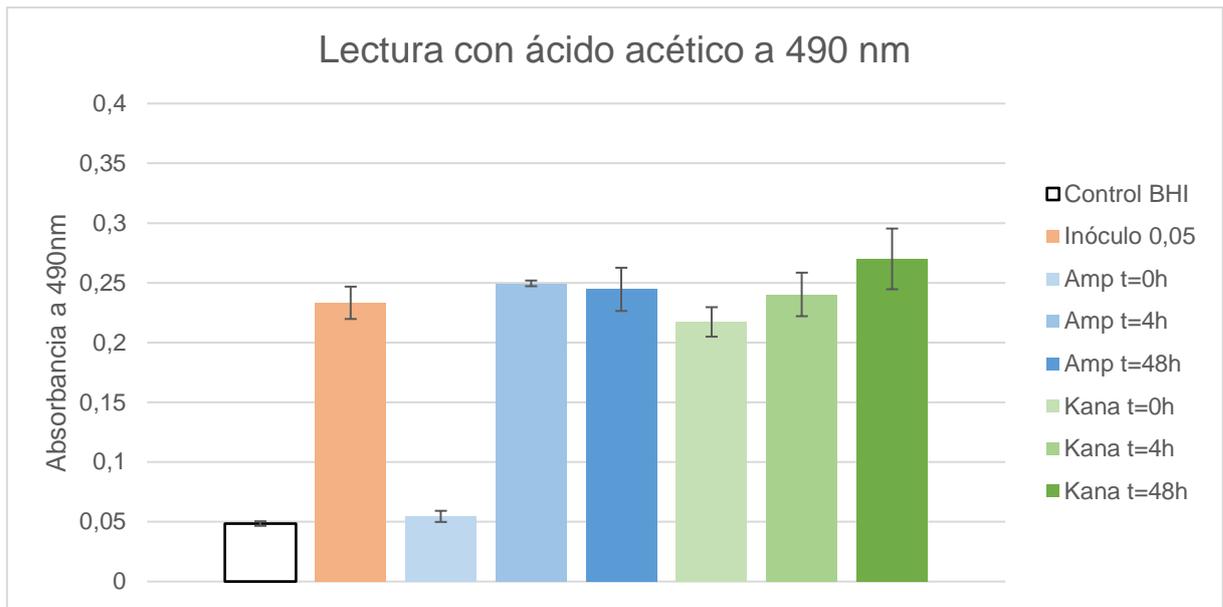


Figura 13. Lectura de placas tratadas con acético (superior) e isopropanol (inferior) a 490 nm.

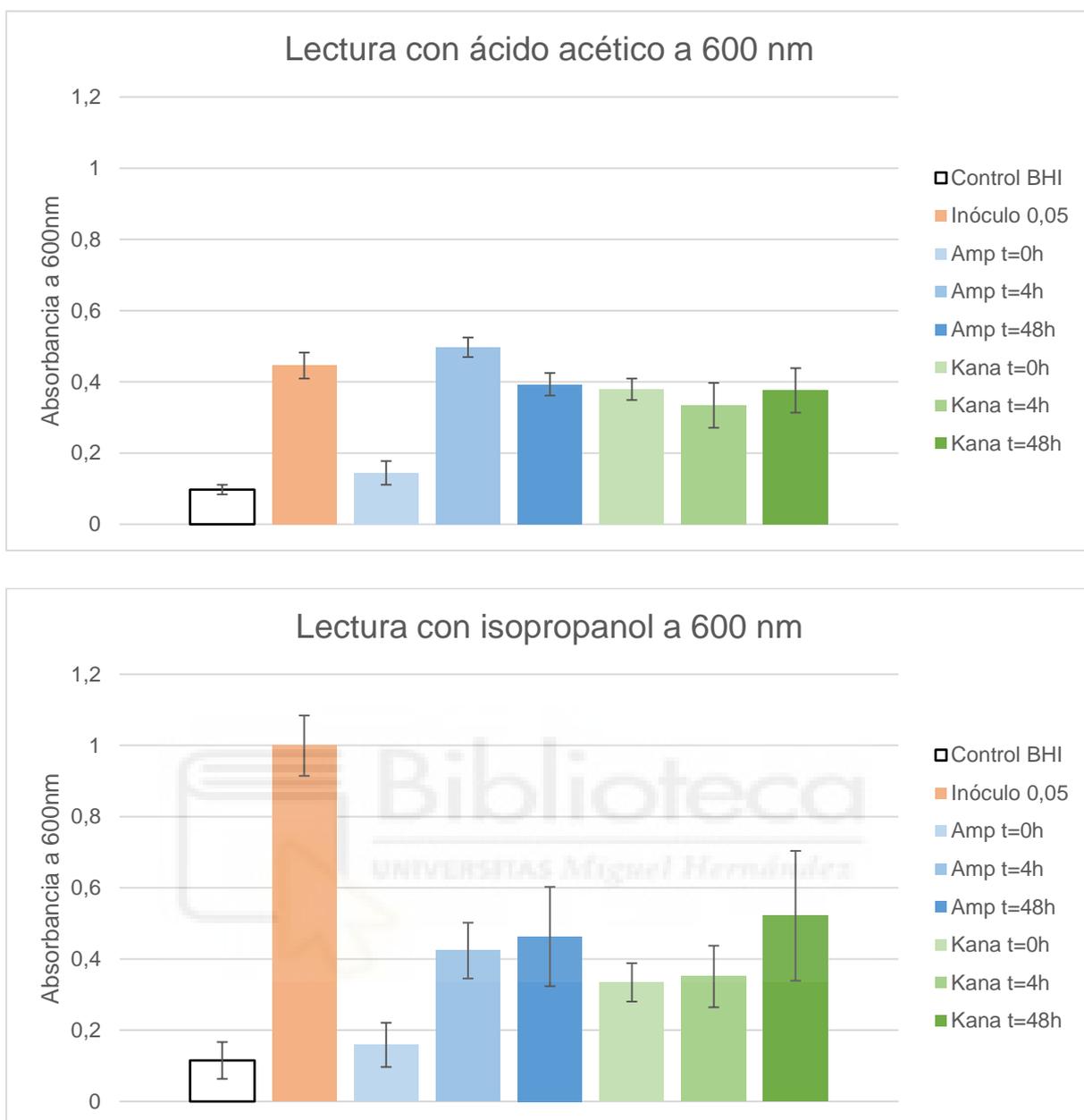


Figura 14. Lectura de placas tratadas con acético (superior) e isopropanol (inferior) a 600 nm.

En el caso de la lectura a 490 nm (Figura 13), podemos ver que los valores de absorbancia obtenidos son mucho menores que en la lectura a 600 nm (Figura 14), lectura por la cual se hubo de diluir las placas, como ya se ha comentado anteriormente. A pesar de que puede observarse una mayor variabilidad de los resultados cuando se usa el isopropanol, en comparación con el ácido acético los resultados son bastante coherentes entre sí. Como el uso del isopropanol es mucho más sencillo y seguro que el uso del ácido acético (no se requiere campana de gases y es mucho menos corrosivo) se decidió que el protocolo en el que se usa este disolvente era el más adecuado para continuar con los experimentos.

Respecto a los antibióticos, de nuevo el único efecto notable producido por estos fue el de ampicilina administrada durante la inoculación (Amp t=0h). Fijándonos en los resultados obtenidos en el tratamiento de los biofilms a las cuarenta y ocho horas, vemos que los resultados de absorbancia son equiparables (si no mayores) a las de los otros tratamientos que tampoco funcionaron. Este es un resultado interesante, teniendo en cuenta que en el experimento anterior se pudo observar una menor absorbancia en los biofilms tratados a las veinticuatro horas. Además, estos biofilms no presentaron una menor adherencia al fondo del pocillo durante su tratamiento, como sí ocurrió con los biofilms que fueron tratados a las veinticuatro horas con antibióticos. Por tanto, se puede concluir que los biofilms bacterianos son más sensibles a las veinticuatro horas de la inoculación que a las cuarenta y ocho horas.

4.7. Ensayo con biofilms tratados con etanol absoluto y etanol al 96%

El objetivo de este ensayo fue probar estos dos compuestos como posibles disolventes del biofilm teñido con cristal violeta para su lectura. Sin embargo, no se consiguió disolver el colorante correctamente en estos compuestos, por lo que el experimento no funcionó como se esperaba y los resultados no fueron concluyentes.

4.8. Ensayo con el protocolo definitivo usando compuestos antimicrobianos

Una vez se determinó que el protocolo más eficaz era el Protocolo 3 con isopropanol como disolvente, este se usó para realizar un último ensayo (Figura 15). Este ensayo consistió en usar diferentes aminas bicíclicas con potencial antimicrobiano que ya habían sido usados en nuestro laboratorio anteriormente (Pertusa, 2019). Los compuestos seleccionados fueron proadifen, atropina y promazina a una concentración final de 1 mM en el momento de la inoculación para ver si causan algún efecto sobre el desarrollo del biofilm.

Los resultados de lectura obtenidos a 490 nm (longitud de onda del isopropanol) de las placas sin diluir fueron los siguientes:

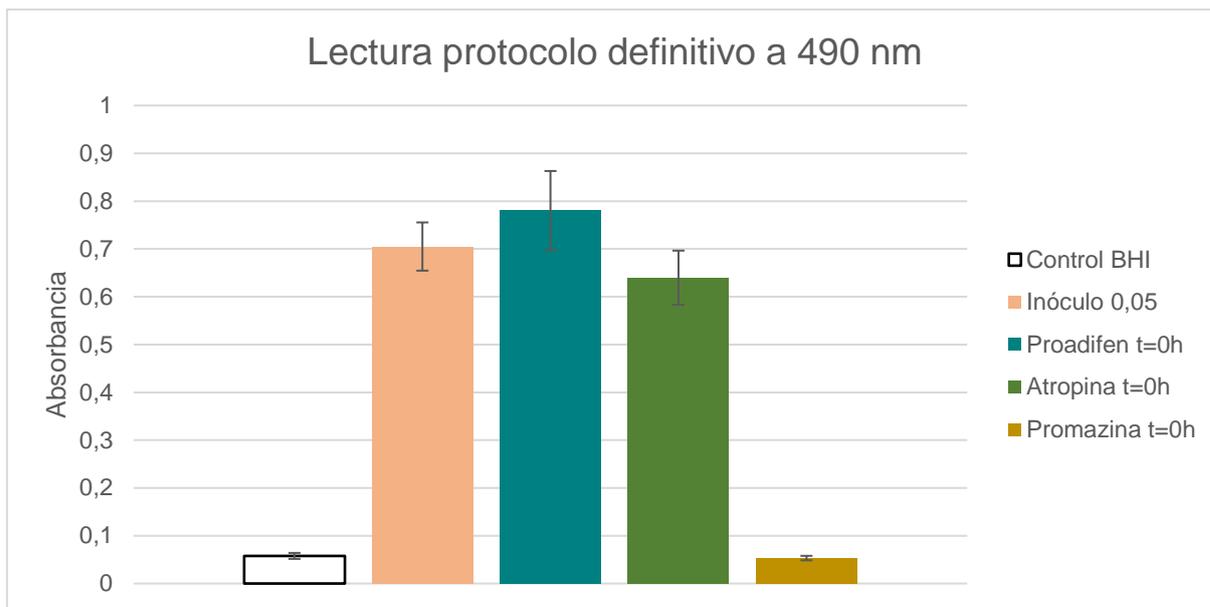


Figura 15. Resultados de absorbancia a 490 nm de la placa tratada con antimicrobianos.

Fijándonos en la figura 15, vemos que hay diferentes resultados en la efectividad de las aminas bicíclicas. En el caso del proadifen, este no ha conseguido afectar al desarrollo del biofilm e incluso se ve una mayor absorbancia que en el control que contiene el inóculo de 0,05 unidades de densidad óptica. Por otro lado, se ve que la atropina sí ha tenido cierto efecto sobre la bacteria, aunque no ha conseguido evitar el desarrollo del biofilm. Sin embargo, en el caso de la promazina vemos que esta sí es efectiva, causando que cuando se administra a tiempo cero, esta es capaz de inhibir totalmente el crecimiento bacteriano.

5. Conclusiones y proyección futura

El principal objetivo de este proyecto era hallar el protocolo idóneo para la formación y establecimiento de biofilms de la bacteria *Streptococcus mutans* para ser utilizado en las instalaciones de la UMH. Este ha resultado ser el Protocolo 3 con isopropanol como disolvente. Este compuesto permite realizar lecturas correctas en la longitud de onda de 490 nanómetros, ya que no se necesita diluir el contenido de los pocillos para obtener unos resultados concluyentes. Además, durante la realización de este trabajo de fin de grado se pudo observar que el cristal violeta usado para teñir los biofilms se disuelve mejor en isopropanol, lo cual también representa una ventaja a la hora de utilizar este compuesto. Por último, al tratarse de un alcohol no muy volátil, no es necesario usarlo en campana de gases y no causa la degradación de los equipos usados para la lectura de placas (como sí es el caso del ácido acético, cuyas microgotas pueden ser un

inconveniente para los lectores de placas a largo plazo si estos requieren la lectura de la placa sin tapa cobertura). Respecto a otros aspectos descubiertos durante el proyecto, se vio que el secado a temperatura ambiente durante veinticuatro horas se puede sustituir por un secado en estufa de hora y media, lo cual es conveniente y más cómodo por la optimización del tiempo requerido para los ensayos.

Por otro lado, se ha visto que compuestos como la kanamicina, ampicilina, hipoclorito sódico y promazina son capaces de afectar al desarrollo del biofilm e incluso de impedir que este se forme. Es interesante destacar que la promazina interfiere con el funcionamiento de las proteínas de unión a colina (CBPs) localizadas en la pared de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, así que puede especularse con la posibilidad de que dicho compuesto esté interfiriendo con alguna de las proteínas de la pared celular involucradas en el establecimiento del biofilm por parte de la bacteria *S. mutants*. Aunque deben de realizarse nuevos experimentos para demostrar dicha hipótesis este último descubrimiento es prometedor de cara al futuro, ya que conocer mejor qué afecta al biofilm y cómo se da este proceso es determinante a la hora de poder desarrollar productos que sirvan como agentes de higiene dental. Haber identificado estos compuestos permite poder realizar una investigación más en profundidad basada en la combinación de los efectos provocados por estos. En general, haber desarrollado un protocolo para el establecimiento de biofilms proporciona una base sólida para continuar con esta investigación, ya que ayudará a reducir el impacto de los procesos cariogénicos y, a largo plazo, a mejorar la salud bucodental mundial.

6. Bibliografía

- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T., ... & Lemos, J. A.** (2018). Biology of oral streptococci. *Microbiology spectrum*, 6(5), 10-1128.
- Alejandra, B. M., & Daniel, O. M.** (2020). Virulence factors of *Streptococcus mutans* related to dental caries. *Staphylococcus and Streptococcus*, 11, 9.
- Balhaddad, A. A., Mokeem, L., Melo, M. A. S., & Gregory, R. L.** (2021). Antibacterial activities of methanol and aqueous extracts of *salvadora persica* against *Streptococcus mutans* biofilms: an in vitro study. *Dentistry Journal*, 9(12), 143.
- Clarke J. K.** (1924). On the Bacterial Factor in the Ætiology of Dental Caries. *British journal of experimental pathology*, 5(3), 141–147.
- GBD (2021a).** Caries of permanent teeth – Level 4 cause. IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation). <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-caries-permanent-teeth-level-4-disease>
- GBD (2021b).** Caries of deciduous teeth – Level 4 cause. IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation). <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-caries-deciduous-teeth-level-4-disease>
- Hasibul, K., Nakayama-Imaohji, H., Hashimoto, M., Yamasaki, H., Ogawa, T., Waki, J., ... & Kuwahara, T.** (2018). D-Tagatose inhibits the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Molecular Medicine Reports*, 17(1), 843-851.
- Khan, R., Adil, M., & Khan, A. U.** (2023). Molecular basis of cariogenic biofilm and infections. En *Elsevier eBooks* (pp. 427-443). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-99977-9.00033-8>
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J.** (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology spectrum*, 7(1), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018>
- Li, J., Wu, T., Peng, W., & Zhu, Y.** (2020). Effects of resveratrol on cariogenic virulence properties of *Streptococcus mutans*. *BMC microbiology*, 20, 1-11.

- Little, W. A., Thomson, L. A., & Bowen, W. H.** (1979). Antibiotic susceptibility of *Streptococcus mutans*: comparison of serotype profiles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 15(3), 440–443. <https://doi.org/10.1128/AAC.15.3.440>
- Matsumoto-Nakano, M.**, Dental Caries, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, 2014, ISBN 9780128012383, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00001-5>
- Ojeda-Garcés, J. C., Oviedo-García, E., & Salas, L. A.** (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES odontología*, 26(1), 44-56.
- OMS (2022)**. Informe sobre la situación mundial de la salud bucodental. Hacia la cobertura sanitaria universal para la salud bucodental de aquí a 2030. Resumen ejecutivo. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364907/9789240061880-spa.pdf?sequence=1>
- Pertusa, M.A. (2019)**. Estudio del potencial antimicrobiano de los análogos de colina frente a la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Priya, A., Nagaiah, H. P., Malligarjunan, N., & Pandian, S. K.** (2023). Oral biofilms: Architecture and control. In *Understanding Microbial Biofilms* (pp. 485-507). Academic Press.
- Žiemytė, M., Carda-Diéguez, M., Rodríguez-Díaz, J. C., Ventero, M. P., Mira, A., & Ferrer, M. D.** (2021). Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth dynamics and persister cells' eradication. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 2062–2075. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1994355>