



Facultad de Ciencias de la Salud

Tema:

Actividad posbiótica de *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus salivarius* sobre biofilms monoespecie y mixtos de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*: estudio *in vitro*

Trabajo de Titulación para la obtención del Título de Especialista en Operatoria dental y estética

Presentada por:

Andrea Michelle Espinosa Martínez

Tutor:

Ing. Boris Villacrés, M.Sc.

Quito, Mayo 2026

Declaración De Aceptación De Norma Ética Y Derechos

El presente documento se ciñe a las normas éticas y reglamentarias de la Universidad Hemisferios. Así, declaro que lo contenido en este ha sido redactado con entera sujeción al respeto de los derechos de autor, citando adecuadamente las fuentes. Por tal motivo, autorizo a la Biblioteca a que haga pública su disponibilidad para lectura dentro de la institución, a la vez que autorizo el uso comercial de mi obra a la Universidad Hemisferios, siempre y cuando se me reconozca el cuarenta por ciento (40%) de los beneficios económicos resultantes de esta explotación.

Además, me comprometo a hacer constar, por todos los medios de publicación, difusión y distribución, que mi obra fue producida en el ámbito académico de la Universidad Hemisferios.

De comprobarse que no cumplí con las estipulaciones éticas, incurriendo en caso de plagio, me someto a las determinaciones que la propia Universidad plantee.

Firma del estudiante

Andrea Michelle Espinosa Martínez

C.I. 1727409235

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo a Dios, por ser mi guía constante, por brindarme fortaleza en los momentos de dificultad y por iluminar mi camino con la sabiduría necesaria para alcanzar esta importante meta; a mi familia, por constituir el pilar fundamental de mi vida, por su amor incondicional y su apoyo permanente a lo largo de este proceso; a mi mami, por su invaluable esfuerzo y por ser mi mayor fuente de inspiración; a mi esposo, por su comprensión, apoyo y compañía incondicional durante este camino; y a mi tutor, por su valiosa orientación y por confiar en mis capacidades, impulsándome a superarme y culminar con éxito este logro. Este resultado no solo me pertenece, sino que también es de ustedes, quienes hicieron posible que perseverara hasta el final.

Índice

ÍNDICE	4
Índice de tablas	6
Índice de figuras.....	7
RESUMEN	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Diseño experimental	15
Activación y caracterización de cepas microbianas.....	17
Preparación de posbióticos monoespecies y multiespecies de <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Streptococcus salivarius</i>	18
Preparación de biofilms monoespecies y mixtos de <i>Candida albicans</i> y <i>Streptococcus mutans</i>	20
Tratamiento in vitro de biofilms monoespecie y mixtos de <i>Candida albicans</i> y <i>Streptococcus mutans</i> mediante posbióticos derivados de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> y su cultivo multiespecie.....	21
Cuantificación del efecto inhibitorio de los posbióticos de <i>L. plantarum</i> , <i>S. salivarius</i> y cultivo multiespecie sobre biofilms de <i>S. mutans</i> , <i>C. albicans</i> y biofilms mixtos, mediante ensayo de cristal violeta	21
Análisis estadístico de la eficiencia de los posbióticos <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> y cultivo multiespecie sobre biofilms orales de <i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mutans</i> y biofilms mixtos.....	22
RESULTADOS	23

Análisis de la formación de biofilms mono-especies de <i>C. albicans</i> , <i>S. mutans</i> y biofilms mixtos.....	23
Análisis del efecto antimicrobiano Posbiótico sobre la formación de biofilms mono-especies y especies mixtas.....	28
Análisis comparativo del efecto del Posbiótico más efectivo, <i>Lactobacillus plantarum</i> , sobre la formación de biofilms mono-especie y mixto	32
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS.....	40

Índice de tablas

Tabla 1. Diseño experimental de los tratamientos evaluados con sobrenadantes posbióticos de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> y su cultivo multiespecie sobre biofilms monoespecie de <i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mutans</i> y biofilms mixtos.	16
Tabla 2. Estadística descriptiva de la formación basal de biofilms monoespecie y mixtos, expresada con densidad óptica 600nm.....	23
Tabla 3. Comparaciones por pares de la formación basal de biofilms monoespecie y el biofilm mixto, obtenidas mediante el análisis post hoc de Dunn con ajuste de Holm.	24
Tabla 4. Estadística descriptiva del efecto de los posbióticos sobre la formación basal de biofilms monoespecie y biofilm mixto, expresada como densidad óptica de 570nm.	29
Tabla 5. Comparaciones múltiples por pares entre los tratamientos posbióticos sobre los biofilms monoespecie y mixto.....	30
Tabla 6. Comparación de la eficacia de los mejores tratamientos con <i>Lactobacillus plantarum</i> sobre la formación de biofilms monoespecie y mixtos.....	33

Índice de figuras

Figura 1. Evaluación de la formación basal de biofilms mono especies y mixto, mediante espectrofotometría y expresada como densidad óptica de 600nm.	25
Figura 2. Distribución de los biofilms en placas de 96 pocillos para <i>Candida albicans</i> (A), <i>Streptococcus mutans</i> (B) y biofilm mixto (<i>C. albicans</i> - <i>S. mutans</i>) (C), evaluados mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm utilizando un equipo Agilent BioTek. Los pocillos H1 y H2 corresponden al control positivo (hipoclorito), mientras que los pocillos H4, H5, H7 y H8 corresponden a controles negativos (agua estéril).	27
Figura 3. Ensayo de difusión en disco para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana posbiótica. (A) Modelo de <i>Streptococcus mutans</i> , (B) Modelo de <i>Candida albicans</i>	28
Figura 4. Evaluación de la efectividad de los tratamientos posbióticos sobre la biomasa de biofilms mono especie y mixto, cuantificada mediante la técnica de cristal violeta y expresada como densidad óptica de 570nm.	32
Figura 5. Eficacia inhibitoria de <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lp) sobre biofilms mono especie y mixto, evaluada mediante densidad óptica de 570nm.	33

Actividad posbiótica de *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus salivarius* sobre biofilms monoespecie y mixtos de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*: estudio *in vitro*

Andrea Michelle Espinosa Martinez

amespinosam@estudiantes.uhemisferios.edu.ec

Resumen

Objetivo: Evaluar la actividad posbiótica de sobrenadantes libres de células (CFS) de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Streptococcus salivarius* ATCC 13419, aplicados individualmente y en combinación, sobre la biomasa de biopelículas monoespecie y mixtas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Candida albicans* ATCC 10231.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio experimental *in vitro*. Se formaron biopelículas de *S. mutans*, *C. albicans* y mixtas (*S. mutans* + *C. albicans*) en microplacas de 96 pocillos recubiertas con saliva humana. Tras 48 horas de maduración, las biopelículas fueron tratadas con CFS de *L. plantarum* (*Lp*), *S. salivarius* (*Ss*) y su mezcla (*Lp-Ss*). La biomasa total se cuantificó mediante el ensayo de cristal violeta a una longitud de onda de 570nm. El análisis estadístico incluyó las pruebas de ANOVA de Welch, Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples post hoc, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Resultados: El biofilm mixto basal presentó una biomasa significativamente mayor que los monocultivos, confirmando una sinergia virulenta. En todos los modelos biológicos, el sobrenadante de *L. plantarum* demostró la mayor eficacia inhibitoria, logrando reducciones significativas de biomasa frente a *C. albicans*, *S. mutans* y el biofilm mixto ($p < 0.05$).

Contrariamente, la combinación de posbióticos (*Lp-Ss*) resultó ser el tratamiento menos efectivo, sugiriendo un antagonismo interespecífico. Aunque *Lp* fue el mejor tratamiento, la biomasa remanente en el biofilm mixto fue superior a la de los monocultivos.

Conclusiones: *Lactobacillus plantarum* exhibe una potente actividad posbiótica de amplio espectro, superior a *S. salivarius* y a la mezcla de ambos, posicionándose como un agente prometedor para el control de biofilms cariogénicos. La resistencia del biofilm mixto y el antagonismo observado entre cepas probióticas subrayan la importancia de seleccionar monoterapias específicas y estrategias de modulación ecológica para el manejo de infecciones polimicrobianas en odontología.

Palabras clave: *Lactobacillus plantarum*; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*; Biofilms; Posbióticos; Sobrenadantes libres de células.

Abstract

Objective: To evaluate the postbiotic activity of cell-free supernatants (CFS) from *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus salivarius*, applied individually and in combination, on the biomass of mono-species and mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Materials and Methods: An *in vitro* experimental study was conducted. Biofilms of *S. mutans*, *C. albicans*, and mixed (*S. mutans* + *C. albicans*) were formed in 96-well microplates coated with human saliva. After 48 hours of maturation, biofilms were treated with CFS from *Lactobacillus plantarum* (*Lp*), *Streptococcus salivarius* (*Ss*), and their combination (*Lp-Ss*). Total biomass was quantified using the crystal violet assay, measuring optical density at a wavelength of 570 nm. Statistical analysis included Welch's ANOVA, Kruskal–Wallis test, and post hoc analyses. Results: The basal mixed biofilm presented significantly higher biomass than mono-cultures, confirming virulent synergy. Across all biological models, *L. plantarum* supernatant demonstrated the highest inhibitory efficacy, achieving significant biomass reductions against *C. albicans*, *S. mutans*, and the mixed biofilm ($p < 0.05$). Conversely, the postbiotics combination (*Lp-Ss*) proved to be the least effective treatment, suggesting interspecific antagonism. Although *Lp* was the superior treatment, the remaining biomass in the mixed biofilm was higher than in mono-cultures. Conclusions: *Lactobacillus plantarum* exhibits potent broad-spectrum postbiotic activity, superior to *S. salivarius* and their mixture, positioning it as a promising agent for cariogenic biofilm control. The resistance of the mixed biofilm and the observed antagonism between probiotic strains highlight the importance of selecting specific monotherapies and ecological modulation strategies for managing polymicrobial infections in dentistry.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*; Biofilms; Postbiotics; Cell-free supernatant

Introducción

Los probióticos son definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped (Food and Agriculture Organization [FAO] & World Health Organization [WHO], 2006).

Tradicionalmente, los microorganismos identificados como agentes probióticos, especialmente los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, han demostrado múltiples beneficios para la salud del huésped, entre los que se incluyen la modulación de la microbiota intestinal, el fortalecimiento de la respuesta inmunológica y la competencia con microorganismos patógenos por sitios de adhesión, nutrientes y factores de crecimiento, lo que ayuda a mantener el equilibrio de la microbiota y protege la salud oral (Luo et al., 2024; Ouwehand et al., 2002). Además de estos efectos beneficiosos, diversas cepas producen compuestos antimicrobianos naturales, como bacteriocinas, altamente eficaces contra patógenos relevantes, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* (Darbandi et al., 2022). Precisamente, la capacidad de estos metabolitos bioactivos para ejercer efectos terapéuticos sin necesidad de células viables ha impulsado el desarrollo de los "posbióticos", definidos como preparaciones de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confieren beneficios para la salud, ofreciendo una alternativa estable y segura a los probióticos convencionales (Salminen et al., 2021).

En la cavidad oral, se han investigado otras especies con potencial probiótico, entre ellas *Streptococcus salivarius* K12 y M18, *Weissella cibaria*, *Lactococcus lactis*, *Propionibacterium freudenreichii* y algunas especies del género *Saccharomyces*. Estas cepas han demostrado efectos beneficiosos en la prevención y control de enfermedades orales,

como caries dental, gingivitis, periodontitis y halitosis, mediante mecanismos que incluyen la inhibición competitiva de patógenos, la producción de compuestos antimicrobianos y la modulación de la respuesta inmune local. De esta manera, los probióticos no solo mantienen el equilibrio microbiano, sino que también reducen la inflamación y previenen la destrucción de los tejidos orales, desempeñando un papel esencial en la promoción y el mantenimiento de la salud bucal (Gönczi et al., 2021; Gruner et al., 2016; Meurman & Stamatova, 2007).

La alta prevalencia de caries dental y enfermedades periodontales constituye un desafío significativo para la salud pública a nivel global. Estas patologías están estrechamente relacionadas con la formación de biopelículas orales de especies mixtas, comúnmente conformadas por *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, cuya interacción sinérgica potencia la virulencia microbiana y dificulta los tratamientos convencionales (Falsetta et al., 2014a). Este panorama se ve agravado por el uso excesivo de antimicrobianos, lo que ha generado unas alternativas terapéuticas más sostenibles y eficaces (Zhu et al., 2025).

La caries dental es una enfermedad multifactorial caracterizada por la desmineralización ácida y la degeneración de la matriz orgánica dental, lo que conduce a la aparición de lesiones cariosas. Entre los factores involucrados, los microorganismos juegan un papel crucial en el desarrollo de la caries dental (Milgrom, 2000). En la cavidad oral se han identificado más de 700 especies microbianas, incluyendo bacterias, hongos, virus, protozoos entre otros (Dewhirst et al., 2010). A pesar de la diversidad de comunidades microbianas presentes en el biofilm oral, el *Streptococcus mutans* se ha considerado uno de los principales patógenos responsables en la iniciación y progresión de la caries dental (Caufield et al., 1993). Este microorganismo posee varios factores de virulencia y es el principal patógeno productor de ácidos relacionado con la caries dental, al colonizar la superficie dental y causar daños en la estructura dental en presencia de carbohidratos fermentables (Banas, 2004).

El *Streptococcus mutans* tiene la capacidad de producir grandes cantidades de polisacáridos extracelulares y ácidos orgánicos tolerantes al pH bajo (Lemos & Burne, 2008); además, puede fermentar rápidamente la sacarosa presente en la dieta y sintetizar glucanos extracelulares mediante exoenzimas como la glucosiltransferasa lo que favorece la adhesión bacteriana a la superficie del diente (Aoki et al., 1986). Este proceso facilita la congregación de bacterias, contribuyendo a la formación de biopelículas compuestas de especies mixtas altamente virulentas, y generando un microambiente acidogénico que desmineraliza el esmalte dental (Loesche, 1986).

La *Cándida albicans* es un hongo oral de gran relevancia que frecuentemente se detecta en biofilms junto con *Streptococcus mutans* (de Carvalho et al., 2006). La presencia de sacarosa en el ambiente juega un papel crucial, ya que favorece la coadhesión y la coexistencia entre estos microorganismos en la cavidad bucal, presentando una interacción sinérgica entre ellos (Falsetta et al., 2014b) La glucosil transferasa se une a la superficie celular de la *Cándida albicans* lo que provoca la producción de grandes cantidades de glucanos en presencia de sacarosa. Esto aumenta los sitios de unión para el *Streptococcus mutans*, favoreciendo la formación de una biopelícula de especies mixtas altamente patógena (Hwang et al., 2015).

Las bacterias probióticas pueden inducir cambios químicos y físicos en el microbioma de la cavidad oral (Tagg et al., 2023). Estas bacterias beneficiosas poseen una mayor capacidad de adhesión a los tejidos orales en comparación con los patógenos, lo que les permite competir eficazmente por los sitios de unión, nutrientes y factores de crecimiento, favoreciendo la agregación y co-agregación bacteriana y la formación de un biofilm con propiedades beneficiosas para la salud oral (Homayouni Rad et al., 2023). Tras su adhesión, los probióticos inhiben la colonización de bacterias patógenas mediante la producción de compuestos antimicrobianos, como bacteriocinas, ácidos orgánicos, ácidos grasos y peróxido

de hidrógeno, contribuyendo así al mantenimiento del equilibrio de la microbiota y a la protección de la salud oral (Cheng et al., 2022; Luo et al., 2024).

En este contexto, el presente estudio *in vitro* se orienta a comprender de manera más precisa la dinámica microbiana involucrada en las biopelículas asociadas a las caries, enfocándose en la interacción entre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Candida albicans* ATCC 10231, patógenos claves en la etiología de esta enfermedad. Con base en ello, se propone el empleo de los posbióticos de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 como una alternativa bioterapéutica capaz de modular o inhibir el desarrollo de estas biopelículas, aportando un enfoque innovador desde la microbiología oral. La exploración de estrategias probióticas resulta especialmente relevante frente al uso excesivo de antimicrobianos, pues ofrece opciones más sostenibles que podrían contribuir a disminuir la presión selectiva asociada a la resistencia microbiana. En conjunto, estos elementos fundamentan la importancia del presente trabajo, cuyo objetivo es evaluar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 sobre biopelículas de especies simples y mixtas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Candida albicans* ATCC 10231 mediante pruebas microbiológicas *in vitro*, generando evidencia aplicable al desarrollo de futuras estrategias preventivas y terapéuticas en salud bucal.

Materiales y métodos

Esta investigación *in vitro* se diseñó para evaluar el efecto inhibitorio del sobrenadante (Posbiótico) producido por microorganismos probióticos, entre ellos: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Streptococcus salivarius* ATCC 13419, tanto de forma individual (monoespecies) como en cultivos mixtos (multiespecies), frente a un biofilm formado por el patógeno más común de la caries dental: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y una levadura persistente en infecciones de enfermedades bucales, *Cándida albicans* ATCC 10231. El efecto inhibitorio fue determinado mediante el ensayo de cristal violeta.

Diseño experimental

El presente estudio fue de tipo experimental, longitudinal y transversal, realizado *in vitro*. Para la selección de los microorganismos utilizados, se establecieron criterios de inclusión y exclusión claramente definidos.

Los criterios de inclusión contemplaron el uso de los siguientes microorganismos patógenos y probióticos cultivables, con capacidad comprobada para formar biopelículas y secretar compuestos antimicrobianos, respectivamente. Se seleccionaron las siguientes cepas: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 como patógeno cariogénico, *Candida albicans* ATCC 10231 como hongo oportunista oral, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 como microorganismos probióticos. Cada cepa fue cultivada en medios específicos adecuados para su desarrollo: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 en agar sangre base enriquecido con 5 % sangre cordero (ASC), *Candida albicans* ATCC 10231 en agar Sabouraud y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 en agar MRS (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

Como criterios de exclusión, se consideraron aquellos microorganismos no patógenos ni probióticos, o que no presentaran capacidad de formar biopelículas ni actividad antimicrobiana conocida. También se excluyeron cepas que no fueran cultivables en las condiciones experimentales establecidas.

Se definieron un total de 9 tratamientos terapéuticos, que se administraron después de la formación del biofilm de especies simples de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Candida albicans* ATCC 10231 y especies mixtas de ambas, con el fin de evaluar la efectividad en la eliminación de biofilms ya establecidos. Cada grupo experimental se analizó mediante 25 repeticiones; además, se incluyeron controles positivos de hipoclorito de sodio al 2.5% y negativos de agua estéril, en total se realizaron 297 análisis.

Tabla 1.

Diseño experimental de los tratamientos evaluados con sobrenadantes posbióticos de Lactobacillus plantarum, Streptococcus salivarius y su cultivo multiespecie sobre biofilms mono especie de Candida albicans, Streptococcus mutans y biofilms mixtos.

TRATAMIENTO	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN
Tratamiento 1	Ca/Lp	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 vs Posbiótico de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
Tratamiento 2	Ca/Ss	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 vs Posbiótico de <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419
Tratamiento 3	Ca/Lp-Ss	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 vs Posbiótico de cultivos mixtos de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 y <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419
		<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 vs Posbiótico de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014

Tratamiento 4	Sm/Lp	
Tratamiento 5	Sm/Ss	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 vs Posbiótico de <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419
Tratamiento 6	Sm/Lp-Ss	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 vs Posbiótico de cultivos mixtos de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 y <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419
Tratamiento 7	Ca-Sm/Lp	Especies mixtas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 vs Posbiótico de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
Tratamiento 8	Ca-Sm/Ss	Especies mixtas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 vs Posbiótico de <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419
Tratamiento 9	Ca-Sm/Lp-Ss	Especies mixtas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 vs Posbiótico de cultivos mixtos de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 y <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419

Biofilms: **Ca:** *Candida albicans* ATCC 1023; **Sm:** *Streptococcus mutans* ATCC 25175; **Ca-Sm** Biofilm Mixto. Postbióticos: **Lp:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; **Ss:** *Streptococcus salivarius* ATCC 13419; **Lp-Ss:** co-cultivo.

Fuente: Elaboracion propia

Activación y caracterización de cepas microbianas

Para el presente estudio, las cepas certificadas de *Lactobacillus plantarum* (Lp) ATCC 8014, *Streptococcus salivarius* (Ss) ATCC 13419 y *Candida albicans* (Ca) ATCC 10231 fueron adquiridas a través de un proveedor especializado en reactivos de biociencias, MEDIBAC. Por otro lado, la cepa de *Streptococcus mutans* (Sm) ATCC 25175 fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología General de la Universidad Hemisferios.

Para la activación de las cepas *L. plantarum* ATCC 8014, *S. salivarius* ATCC 13419 y *C. albicans* ATCC 10231, se emplearon medios de cultivo específicos, para *L. plantarum* ATCC 8014 agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), para *Cándida albicans* ATCC 1023 agar saboraud y para *S. mutans* ATCC 25175 y *S. salivarius* ATCC 13419 en agar sangre base enriquecido con 5 % sangre cordero (ASC) (BD, USA)., los cuales fueron preparados mediante la reconstitución de los polvos deshidratados en agua destilada estéril, siguiendo las proporciones recomendadas por el fabricante y ajustando el volumen a las necesidades del experimento. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 horas; en el caso de *S. salivarius* y *L. plantarum*, las placas inoculadas se colocaron previamente en una cámara de anaerobiosis antes de ser transferidas a la incubadora. En cuanto a *C. albicans* fue sembrada en agar Sabouraud, las placas se incubaron en condiciones aerobias y de inmediato se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su adecuada estabilización.

Para la caracterización de las cepas se realizaron las pruebas de tinción Gram, catalasa, fermentación de azúcares, manitol, ureasa, así como características fenotípicas de las colonias. En conjunto, los resultados obtenidos confirmaron la idoneidad de las cepas para los ensayos posteriores.

Preparación de posbióticos monoespecies y multiespecies de *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus salivarius*

La obtención de los sobrenadantes (posbióticos) se basó en la metodología descrita por (Srivastava et al., 2020), con ligeras modificaciones. Para la obtención de los sobrenadantes, se colocaron de 2 a 3 colonias de cada cepa probiótica (*L. plantarum* y *S. salivarius*) en un tubo de ensayo con 3 ml de caldo MRS y caldo Brain Heart Infusion (BHI) para *L. plantarum* y *S. salivarius* respectivamente, hasta alcanzar una concentración de 0.5 McFarland. Para la preparación del cultivo multiespecie *Lp-Ss*, se mezclaron volúmenes

iguales (1:1) de los cultivos ajustados previamente a 0.5 McFarland de *L. plantarum* y *S. salivarius*, se utilizó caldo BHI modificado con 0.5% de glucosa (BHIglu) (BD, USA) como medio de cultivo. Los inóculos fueron incubados en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, las suspensiones bacterianas fueron sometidas a centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue cuidadosamente recuperado con una micropipeta, evitando la perturbación del pellet celular, y transferido a microtubos estériles. Los sobrenadantes fueron esterilizados a través de membranas de 0,22 µm y conservados a 4 °C en un contenedor refrigerado. Estos posbióticos estandarizados se utilizaron inmediatamente en todos los tratamientos del estudio.

La verificación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se realizó, por triplicado, mediante un ensayo de difusión en disco con el fin de confirmar la sensibilidad preliminar de los patógenos frente a los metabolitos probióticos. Para ello, se inocularon placas de Agar Sabouraud con *C. albicans* y Agar Sangre con *S. mutans* empleando la técnica de hisopado masivo para obtener un crecimiento confluyente. Posteriormente, se dispusieron sobre la superficie del agar discos de papel filtro estériles, los cuales fueron impregnados con 20 µL de los sobrenadantes de *L. plantarum*, *S. salivarius* y su mezcla (multiespecie), incluyendo además un control positivo. Con el objetivo de estandarizar las condiciones experimentales y favorecer el metabolismo de los posbióticos, todas las placas se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 48 horas. Finalmente, la capacidad inhibitoria se determinó cualitativamente mediante la observación de los halos de inhibición formados alrededor de los discos.

Preparación de biofilms monoespecies y mixtos de *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*

Previo a la formación del biofilm en microplacas de 96 pocillos, estas fueron recubiertas con saliva humana, con el fin de favorecer la adhesión a la superficie. La saliva fue obtenida de un único donante sano, sin enfermedad periodontal, ni caries dental, quien realizó un enjuague bucal con agua destilada y evitó la estimulación salival mediante agentes externos, siguiendo protocolos previamente establecidos y con pocas modificaciones (Kim et al., 2021). Aproximadamente 20 ml de saliva fueron recolectados en un frasco estéril.

Las muestras de saliva fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min; el sobrenadante salival fue retirado cuidadosamente y luego esterilizado a través de una membrana de 0,22 μm para asegurar la eliminación de posibles contaminantes microbianos. Posteriormente, se distribuyeron 100 μl de saliva en cada pocillo de las microplacas y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, el excedente de saliva fue eliminado, dejando los pocillos preparados para la formación de los biofilms.

El cultivo inicial se preparó a partir de colonias de *C. albicans* y *S. mutans*, las cuales fueron resuspendidas en PBS estéril con pH 7.2 y ajustadas a una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland. Una vez estandarizadas, las suspensiones se emplearon para la inoculación en microplacas, utilizando caldo BHI suplementado con 0,5 % de glucosa (BHIglu) como medio de crecimiento. En cada pocillo se colocaron 100 μl de *C. albicans*, 100 μl de *S. mutans*, y para el cultivo mixto se colocaron 75 μl de *S. mutans* más 25 μl de *C. albicans*. Posteriormente, se adicionaron 100 μl de BHIglu en cada pocillo.

Como controles experimentales se incluyeron hipoclorito de sodio al 2.5% (control positivo), agua estéril (control negativo) y caldo BHI sin inoculación en otros pocillos.

Asimismo, se reservaron cuatro pocillos como blancos para la lectura en el espectrofotómetro.

Finalmente, las placas fueron incubadas durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis, con agitación suave a 80 rpm. La validación de biofilm se confirmó, por separado, mediante espectrofotómetro de la marca AGILENT Bio Tek, a longitudes de onda 570nm cuando se tiñeron con Cristal violeta y de 600nm sin Cristal violeta. Además, se confirmó la presencia de las especies microbianas a través de cultivos en agares y pruebas bioquímicas.

Tratamiento *in vitro* de biofilms monoespecie y mixtos de *Candida albicans* y *Streptococcus mutans* mediante posbióticos derivados de *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* y su cultivo multiespecie

Posterior a la formación y medición de los biofilms, se añadieron 50 µl de posbióticos de *L. plantarum*, *S. salivarius* y *Lp-Ss* a los pocillos correspondientes que contenían los biofilms establecidos (*Ca*, *Sm*, *Ca-Sm*). Las placas fueron incubadas durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis para evaluar el efecto de los sobrenadantes sobre la biomasa microbiana.

Cuantificación del efecto inhibitorio de los posbióticos de *L. plantarum*, *S. salivarius* y cultivo multiespecie sobre biofilms de *S. mutans*, *C. albicans* y biofilms mixtos, mediante ensayo de cristal violeta

La cuantificación de los biofilms se realizó mediante el protocolo de cristal violeta (Srivastava et al., 2020), la cual permite estimar la biomasa total del biofilm. Para ello, el sobrenadante con células planctónicas fue retirado cuidadosamente de cada pocillo, seguido de dos lavados con 200 µl de PBS pH 7.2 para eliminar restos celulares no adheridos. Los

biofilms fueron fijados con 100 μ l de metanol al 100 % durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se retiró el exceso. A continuación, se añadieron 100 μ l de solución de cristal violeta al 0,1 % en cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con agua estéril para eliminar el exceso de colorante. El cristal violeta adherido al biofilm se disolvió con 100 μ l de etanol al 95 % por pocillo por 15 minutos, y el extracto obtenido se transfirió a una nueva microplaca estéril de 96 pocillos. La absorbancia de cada muestra se midió a 570 nm mediante espectrofotometría.

Análisis estadístico de la eficiencia de los posbióticos *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* y cultivo multiespecie sobre biofilms orales de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y biofilms mixtos.

El procesamiento de datos y el análisis estadístico se llevaron a cabo empleando el software R, estableciendo un nivel de significancia de ($p < 0.05$) para todas las pruebas. Inicialmente, se realizó un análisis descriptivo para obtener medidas de tendencia central y dispersión, seguido de la evaluación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La selección de la prueba de hipótesis para las comparaciones entre grupos se determinó en función del cumplimiento de dichos supuestos: se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía con prueba post hoc de Tukey HSD para datos paramétricos homocedásticos; el ANOVA de Welch seguido de la prueba post hoc de Games-Howell para datos con distribución normal que presentaron heterocedasticidad; y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, complementada con comparaciones por pares mediante la prueba de Dunn con ajuste de Holm, para aquellos conjuntos de datos que no siguieron una distribución normal.

Resultados

La evaluación de la actividad posbiótica se llevó a cabo mediante un diseño experimental sistemático que comprendió un total de 297 análisis, derivados de 25 repeticiones por cada uno de los 9 tratamientos terapéuticos evaluados. Estos incluyeron la aplicación de sobrenadantes libres de células (CFS) de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 y su combinación, sobre biopelículas maduras de *Candida albicans* ATCC 10231, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y el modelo de biofilm mixto. La validez del ensayo fue respaldada por la inclusión de controles negativos (agua estéril) y controles positivos (hipoclorito de sodio al 2.5%), permitiendo una comparación estadística de la biomasa remanente tras la intervención con los posbióticos.

Análisis de la formación de biofilms monoespecies de *C. albicans*, *S. mutans* y biofilms mixtos

Dado que no todos los grupos cumplieron con el supuesto de normalidad, se emplearon pruebas no paramétricas, las cuales demostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) tanto en la comparación global como en las comparaciones por pares (Tabla 3).

Tabla 2.

Estadística descriptiva de la formación basal de biofilms monoespecie y mixtos, expresada con densidad óptica 600nm.

Biofilms	Media	Mediana	Maximo	1er cuartil	3er cuartil	Desv.Estandar
Ca	0.7502	0.7488	1.0837	0.6767	0.8240	0.1023
Sm	0.6365	0.6308	0.8798	0.5637	0.7057	0.0959
Ca-Sm	0.9208	0.9065	1.1805	0.8645	0.9665	0.0819

Ca: *Candida albicans* ATCC 1023; Sm: *Streptococcus mutans* ATCC 25175; Ca-Sm Biofilm Mixto

Tabla 3.

Comparaciones por pares de la formación basal de biofilms monoespecie y el biofilm mixto, obtenidas mediante el análisis post hoc de Dunn con ajuste de Holm.

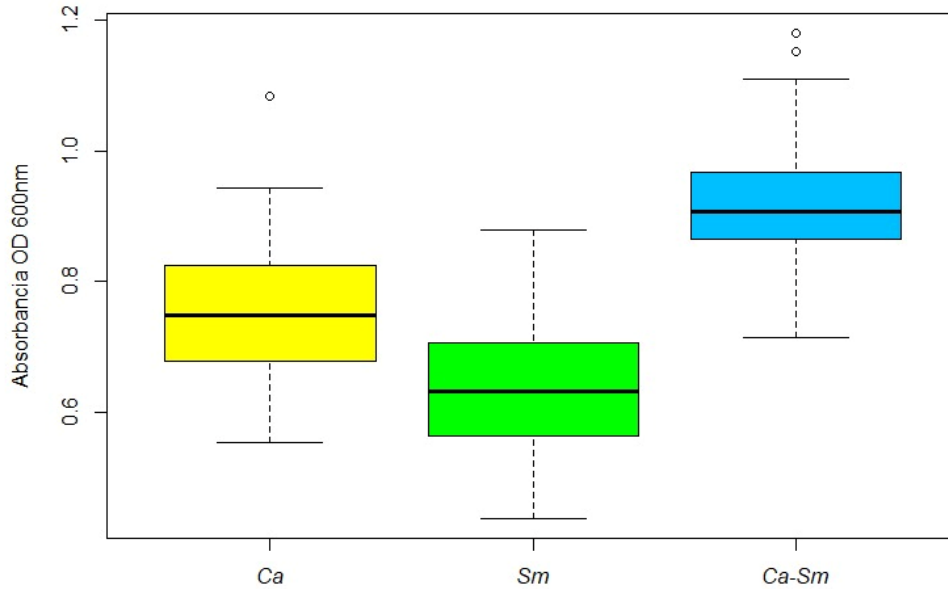
Comparación	P.adj
Ca/Ca-Sm	1.108711×10^{-13}
Ca/Sm	1.503833×10^{-6}
Ca-Sm	1.893002×10^{-34}

Ca: *Candida albicans* ATCC 1023; **Sm:** *Streptococcus mutans* ATCC 25175; **Ca-Sm** Biofilm Mixto

La estadística descriptiva (Tabla 2) evidenció que, a una longitud de onda de 600nm, la media de la capacidad de formación de biofilm mixto *Ca-Sm* presentó los valores más altos (0.9208 ± 0.0819 , seguido del monocultivo de *Ca* (0.7502 ± 0.1023), mientras que *Sm* (0.6365 ± 0.0959) mostró la menor formación de biofilm (Figura 1), indicando que la interacción polimicrobiana favorece la formación de una biopelícula más densa en comparación con los cultivos monoespecie.

Figura 1.

Evaluación de la formación basal de biofilms monoespecies y mixto, mediante espectrofotometría y expresada como densidad óptica de 600nm.



Ca: *Candida albicans* ATCC 1023; **Sm:** *Streptococcus mutans* ATCC 25175; **Ca-Sm** Biofilm Mixto

La evaluación espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 600 nm utilizando un espectrofotómetro Agilent BioTek. La lectura se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, donde el haz de luz atravesó cada pocillo de manera individual, permitiendo cuantificar la densidad óptica como indicador indirecto de la biomasa del biofilm. El análisis se efectuó mediante la medición por áreas en cada pocillo de la microplaca.

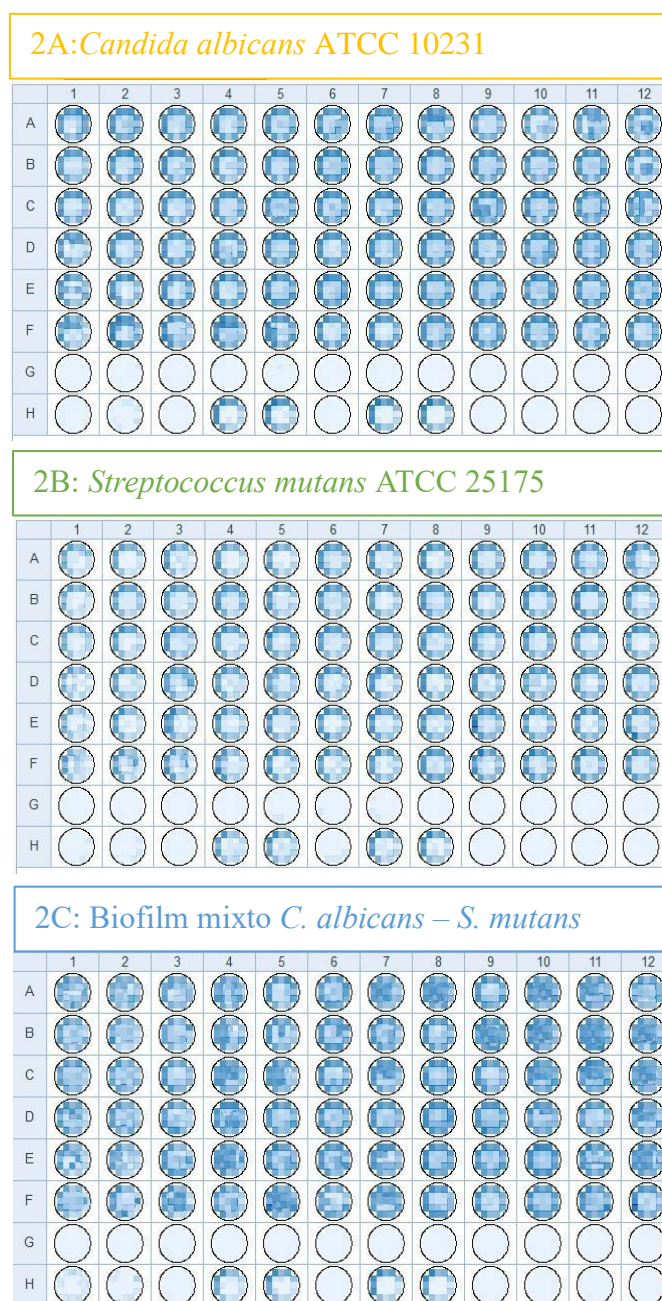
Se emplearon tres placas independientes: (2A) biofilm de *Candida albicans*, (2B) biofilm de *Streptococcus mutans* y (2C) biofilm mixto (*C. albicans* - *S. mutans*). En cada placa, los pocillos comprendidos entre A1 y F12 fueron destinados a la formación de biofilm. Los pocillos H1 y H2 correspondieron al control positivo (hipoclorito), mientras que los pocillos H4, H5, H7 y H8 se utilizaron como controles negativos (agua estéril). Como se observa en la Figura 2, la distribución experimental fue homogénea en las tres placas,

permitiendo la comparación entre biofilms monoespecie y mixto bajo las mismas condiciones experimentales.

En cuanto a los resultados, el biofilm mixto (Figura 2C), correspondiente a *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*, presentó la mayor densidad de biomasa, lo que sugiere una interacción sinérgica entre ambas especies que favorece la formación y estructuración del biofilm. En segundo lugar, el monocultivo de *Candida albicans* (Figura 2A) mostró una capacidad intermedia de formación, mientras que *Streptococcus mutans* (Figura 2B) presentó los valores más bajos de densidad óptica, indicando una menor producción de biomasa en condiciones individuales. En conjunto, estos resultados evidencian que la interacción polimicrobiana incrementa la formación de biofilm en comparación con los cultivos monoespecie, en concordancia con la mayor complejidad estructural de los biofilms mixtos.

Figura 2.

Distribución de los biofilms en placas de 96 pocillos para *Candida albicans* (A), *Streptococcus mutans* (B) y biofilm mixto (*C. albicans* - *S. mutans*) (C), evaluados mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm utilizando un equipo Agilent BioTek. Los pocillos H1 y H2 corresponden al control positivo (hipoclorito), mientras que los pocillos H4, H5, H7 y H8 corresponden a controles negativos (agua estéril).

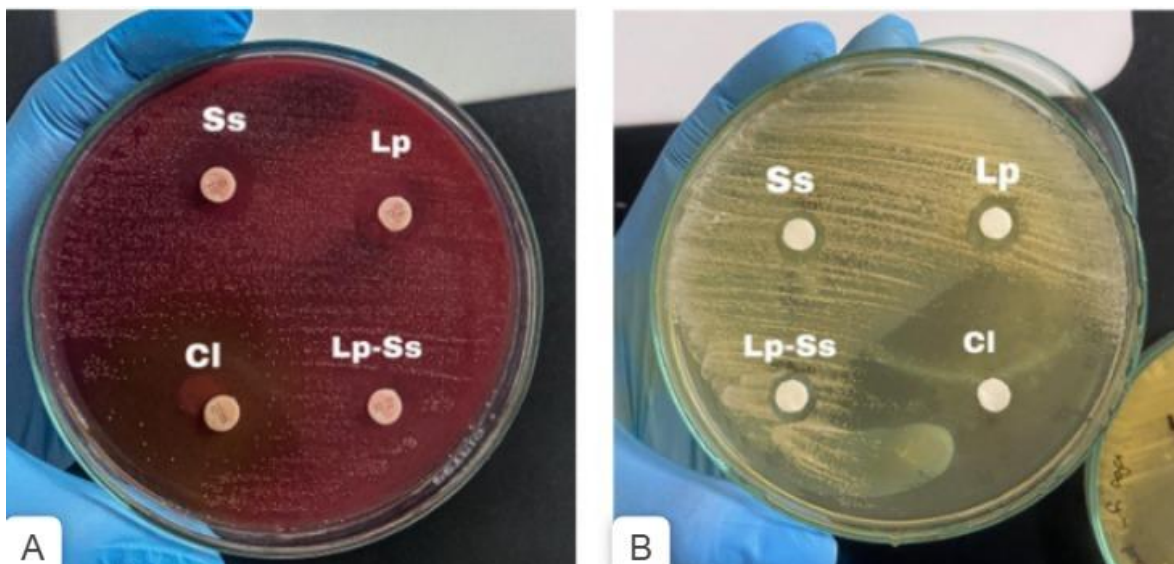


Análisis del efecto antimicrobiano Posbiótico sobre la formación de biofilms monoespecies y especies mixtas

El ensayo preliminar de difusión en disco confirmó la capacidad antimicrobiana de los posbióticos evaluados, tras validar que las caracterizaciones bioquímicas de todas las cepas fueron consistentes con sus perfiles de referencia. En el análisis de *S. mutans* (Figura 3A), se identificaron halos de inhibición pequeños pero definidos; el mayor diámetro fue producido por *L. plantarum*, seguido en orden decreciente por *S. salivarius* y la combinación *Lp-Ss*. De manera similar, frente a *C. albicans* (Figura 3B), se observó una respuesta inhibitoria de menor magnitud con halos reducidos, donde el halo más prominente correspondió nuevamente a *L. plantarum*, mientras que el tratamiento combinado *Lp-Ss* evidenció la menor actividad antifúngica. En ambos modelos, el control positivo (CI) mostró una inhibición total, ratificando la susceptibilidad microbiana necesaria para proceder con los ensayos de biopelícula.

Figura 3.

Ensayo de difusión en disco para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana posbiótica. (A) Modelo de Streptococcus mutans, (B) Modelo de Candida albicans.



El análisis estadístico de los datos obtenidos por espectrofotometría (ensayo de cristal violeta), pudo evidenciar que en el modelo de *Candida albicans*, el ANOVA de Welch presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). De acuerdo con la estadística descriptiva de la Tabla 4, el posbiótico de *Lactobacillus plantarum* (Lp) presentó la menor formación de biofilm (0.1915 ± 0.0447), seguido por *Streptococcus salivarius* (Ss) (0.3325 ± 0.0655), mientras que la combinación Lp-Ss mostró la mayor biomasa (0.4722 ± 0.0789). Las comparaciones post hoc de Games-Howell (Tabla 5) confirmaron que todas las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Estos resultados se observan claramente en la distribución de los datos en la Figura 4A.

Tabla 4.

Estadística descriptiva del efecto de los posbióticos sobre la formación basal de biofilms monoespecie y biofilm mixto, expresada como densidad óptica de 570nm.

Biofilms	Media	Mediana	Máximo	1er cuartil	3er cuartil	Desv.Estandar
Ca/Lp	0.1915	0.1988	0.2500	0.1547	0.2278	0.0447
Ca/Ss	0.3325	0.3238	0.4358	0.2843	0.3857	0.0655
Ca/Lp-Ss	0.4722	0.4718	0.6734	0.4218	0.5272	0.0789
Sm/Lp	0.1746	0.1612	0.2912	0.1157	0.2431	0.0695
Sm/Ss	0.2657	0.2752	0.4173	0.2018	0.3261	0.0767
Sm/Lp-Ss	0.3176	0.3113	0.4733	0.3013	0.3429	0.0473
Ca-Sm/Lp	0.3189	0.3113	0.4903	0.2352	0.3985	0.1023
Ca-Sm/Ss	0.4524	0.4602	0.6710	0.3952	0.5172	0.1036
Ca-Sm/Lp-Ss	0.6015	0.5893	0.7722	0.5473	0.6633	0.0802

Biofilms: **Ca:** *Candida albicans* ATCC 1023; **Sm:** *Streptococcus mutans* ATCC 25175; **Ca-Sm** Biofilm Mixto. Posbióticos: **Lp:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; **Ss:** *Streptococcus salivarius* ATCC 13419; **Lp-Ss:** co-cultivo.

Tabla 5.

Comparaciones múltiples por pares entre los tratamientos posbióticos sobre los biofilms monoespecie y mixto.

Comparación	P.adj
Ca+Lp-Ss vs Ca+Lp	8.71×10^{-13}
Ca+Ss vs Ca+Lp	1.42×10^{-11}
Ca+Ss vs Ca+Lp-Ss	1.32×10^{-8}
Sm+Lp vs Sm+Lp-Ss	3.36×10^{-9}
Sm+Lp vs Sm+Ss	2.99×10^{-4}
Sm+Lp-Ss vs Sm+Ss	2.15×10^{-2}
Ca-Sm + Lp-Ss vs Ca-Sm + Lp	0.00×10^0
Ca-Sm + Ss vs Ca-Sm + Lp	6.70×10^{-6}
Ca-Sm + Ss vs Ca-Sm + Lp-Ss	8.30×10^1

Biofilms: **Ca:** *Candida albicans* ATCC 1023; **Sm:** *Streptococcus mutans* ATCC 25175; **Ca-Sm** Biofilm Mixto. Posbióticos: **Lp:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; **Ss:** *Streptococcus salivarius* ATCC 13419; **Lp-Ss:** co-cultivo.

En el modelo de *Candida albicans*, el ANOVA de Welch evidenció diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). De acuerdo con la estadística descriptiva presentada en la (Tabla 4), el postbiótico de *Lactobacillus plantarum* (*Lp*) presentó la menor formación de biofilm (0.1915 ± 0.0447), seguido por *Streptococcus salivarius* (*Ss*) (0.3325 ± 0.0655), mientras que la combinación (*Lp-Ss*) mostró la mayor biomasa (0.4722 ± 0.0789). Las comparaciones post hoc de Games-Howell (Tabla 5) confirmaron que todas las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Estos resultados se observan claramente en la distribución de los datos en la Figura 4A.

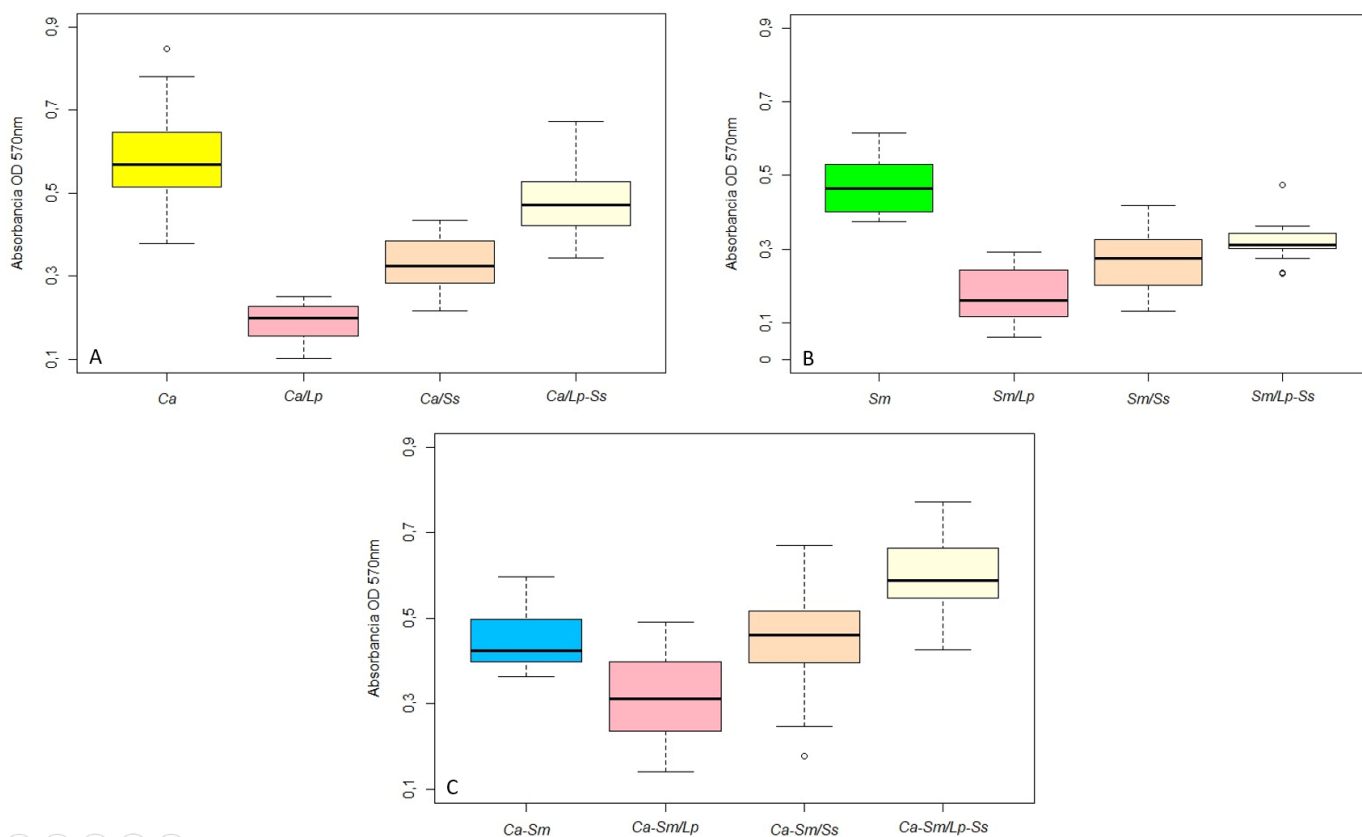
De manera concordante, en los biofilms de *Streptococcus mutans*, la prueba de Kruskal-Wallis evidenció diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Según la estadística descriptiva (Tabla 4), el tratamiento con *L. plantarum* (*Lp*) presentó la mayor capacidad inhibitoria (0.1746 ± 0.0695), seguido por *S. salivarius* (*Ss*) (0.2657 ± 0.0767),

mientras que la combinación (*Lp-Ss*) mostró la menor eficacia (0.3176 ± 0.0473). El análisis post hoc de Dunn (Tabla 5) confirmó diferencias significativas entre todos los grupos ($p < 0.05$). Estos hallazgos se visualizan en la Figura 4B, observándose además que la combinación *Lp-Ss* fue menos eficaz incluso que *S. salivarius*, lo que sugiere la ausencia de un efecto sinérgico.

En el modelo de biofilm mixto (*Candida albicans* - *Streptococcus mutans*), el ANOVA de una vía evidenció diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). De acuerdo con la estadística descriptiva presentada en la Tabla 4, el tratamiento con *L. plantarum* mostró la menor formación de biofilm (0.3189 ± 0.1023), seguido por *S. salivarius* (0.4524 ± 0.1036), mientras que la combinación *Lp-Ss* presentó la mayor biomasa (0.6015 ± 0.0802). Las comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey HSD (Tabla 5) confirmaron diferencias significativas entre todos los grupos ($p < 0.05$). Estos resultados se observan en la Figura 4C y evidencian que, aunque *L. plantarum* mantiene la mayor capacidad inhibitoria, el biofilm mixto presenta mayor biomasa residual en comparación con los monocultivos, lo que sugiere una mayor resistencia del modelo polimicrobiano frente a los tratamientos.

Figura 4.

Evaluación de la efectividad de los tratamientos posbióticos sobre la biomasa de biofilms mono especie y mixto, cuantificada mediante la técnica de cristal violeta y expresada como densidad óptica de 570nm.



Biofilms: **Ca:** *Candida albicans* ATCC 1023; **Sm:** *Streptococcus mutans* ATCC 25175; **Ca-Sm** Biofilm Mixto. Posbióticos: **Lp:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; **Ss:** *Streptococcus salivarius* ATCC 13419; **Lp-Ss:** co-cultivo.

Análisis comparativo del efecto del Posbiótico más efectivo, *Lactobacillus plantarum*, sobre la formación de biofilms mono especie y mixto

Finalmente, se realizó un análisis comparativo transversal para evaluar si la eficacia del Posbiótico más efectivo, *L. plantarum*, varió según la complejidad estructural del biofilm. Los datos descriptivos de la (Tabla 4) muestran que la formación del biofilm fue mayor en el

modelo mixto (*Ca-Sm*) (0.3189 ± 0.1023), intermedia en *C. albicans* (0.1915 ± 0.0447) y menor en *S. mutans* (0.1746 ± 0.0695), evidenciando diferencias en la densidad de biomasa basal entre los distintos sistemas biológicos.

Tabla 6.

Comparación de la eficacia de los mejores tratamientos con Lactobacillus plantarum sobre la formación de biofilms monoespecie y mixtos.

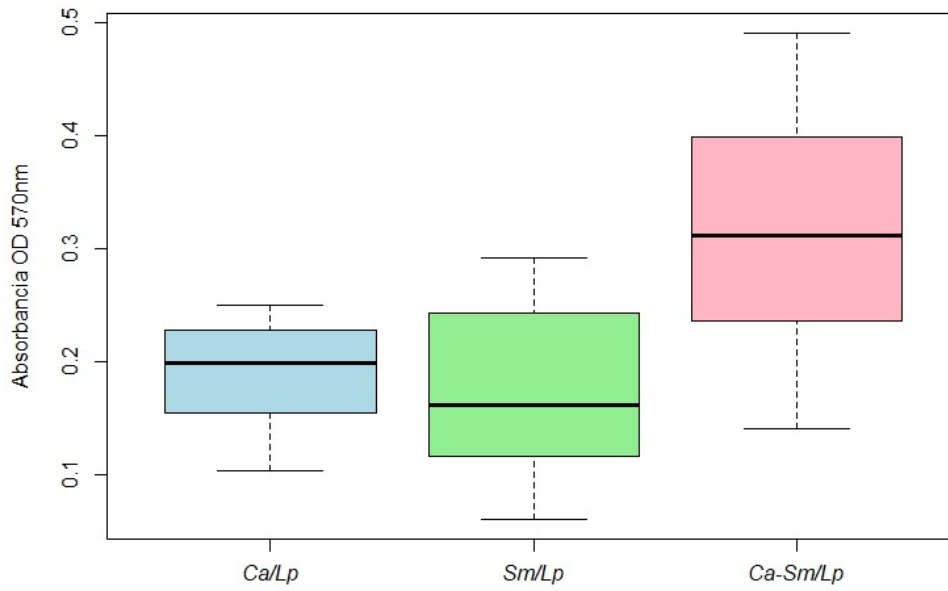
Comparación	P.adj
Ca+Lp vs Ca-Sm+LP	4.302199×10^{-5}
Ca+Lp vs Sm+Lp	4.573072×10^{-1}
Ca-Sm+Lp Vs Sm+Lp	1.793749×10^{-6}

Biofilms: **Ca:** *Candida albicans* ATCC 1023; **Sm:** *Streptococcus mutans* ATCC 25175; **Ca-Sm** Biofilm Mixto. Postbióticos: **Lp:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; **Ss:** *Streptococcus salivarius* ATCC 13419; **Lp-Ss:** co-cultivo.

El gráfico de comparación de los mejores tratamientos con *L. plantarum* (Figura 5) y los datos de la (Tabla 6) confirman que *L. plantarum* mantiene una alta capacidad inhibitoria frente a los monocultivos de *C. albicans* y *S. mutans*, mientras que en el biofilm mixto (*Ca-Sm*) la biomasa residual tras el tratamiento con *L. plantarum* fue significativamente mayor ($p < 0.05$). Estos hallazgos indican que, aunque *L. plantarum* es el posbiótico más eficaz en todos los modelos evaluados, la complejidad polimicrobiana del biofilm mixto confiere una resistencia estructural superior que limita su erradicación completa.

Figura 5.

Eficacia inhibitoria de Lactobacillus plantarum (Lp) sobre biofilms monoespecie y mixto, evaluada mediante densidad óptica de 570nm.



Biofilms: **Ca**: *Candida albicans* ATCC 1023; **Sm**: *Streptococcus mutans* ATCC 25175; **Ca-Sm** Biofilm Mixto.
Postbioticos: **Lp**: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

Discusión

El presente estudio se diseñó con el propósito de evaluar el potencial de los posbióticos derivados de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Streptococcus salivarius* ATCC 13419 como agentes alternativos para el control de biofilms orales patógenos. Los hallazgos principales revelaron que el sobrenadante de *L. plantarum* posee la mayor actividad inhibitoria frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175, tanto en sus formas individuales como en co-cultivo, superando en eficacia a *S. salivarius* y, de manera notable, a la combinación de ambos probióticos.

En primera instancia, el análisis de la formación basal de los biofilms confirmó que la interacción entre *C. albicans* y *S. mutans* genera una estructura biológica significativamente más densa y resistente que la de las especies por separado. Este fenómeno de sinergia corrobora los hallazgos fundamentales del estudio seminal de **(Falsetta et al., 2014b)** quienes describieron por primera vez el mecanismo molecular mediante el cual las exoenzimas de *S. mutans* se anclan a la pared celular del hongo. Investigaciones recientes, como la de **(Du et al., 2020)**, han revalidado este modelo, confirmando que dicha unión facilita la producción de una matriz rica en glucanos y fructanos que actúa como un "pegamento biológico", envolviendo a ambos microorganismos y creando un ambiente protegido que explica la alta densidad de biomasa observada en los biofilms mixtos creados en la presente investigación.

Respecto a las estrategias terapéuticas, el sobrenadante de *L. plantarum* demostró ser el agente más efectivo en todos los escenarios. La actividad antimicrobiana observada puede atribuirse a la secreción de ácidos orgánicos y moléculas de bajo peso molecular. Estudios recientes como el de **(Zhang et al., 2020)**, han evidenciado que *L. plantarum* presenta actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, reduciendo su crecimiento y viabilidad, lo que podría estar relacionado con la acción de sus metabolitos bioactivos. De

igual manera, su eficacia frente a *C. albicans* concuerda con lo expuesto recientemente por (Parolin et al., 2021), quienes demostraron que los metabolitos de estos lactobacilos, tales como ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico), ejercen un efecto antifúngico, afectando la viabilidad y capacidad de colonización de este microorganismo.

Por otro lado, el sobrenadante de *S. salivarius* mostró una actividad inhibitoria significativa, aunque inferior a la de *L. plantarum*. Este comportamiento se alinea con los principios establecidos por (Tagg, 2004), investigador pionero que definió las sustancias inhibitoras tipo bacteriocinas (BLIS) producidas por esta especie. Si bien estas proteínas son efectivas para la competencia ecológica y la prevención, revisiones sistemáticas como la de (Inchingolo et al., 2025; Poorni et al., 2019) sugieren que, una vez que el biofilm está maduro, estas macromoléculas tienen mayor dificultad para penetrar la estructura en comparación con los ácidos orgánicos más pequeños producidos por los lactobacilos, lo que explicaría la diferencia de eficacia en nuestro estudio.

Un hallazgo relevante de esta investigación fue que la combinación de ambos sobrenadantes resultó menos eficaz que su uso individual, lo que sugiere una posible interacción antagonista. En este sentido, (Stavropoulou & Bezirtzoglou, 2020) señalan que las mezclas probióticas pueden presentar interferencias que afectan su actividad biológica. Aunque en el presente estudio no se evaluaron parámetros fisicoquímicos como el pH ni la estabilidad de los metabolitos, es posible que interacciones entre los compuestos bioactivos de ambas cepas hayan influido en la reducción del efecto observado. Este resultado resalta la importancia de evaluar la compatibilidad entre cepas en el desarrollo de terapias probióticas y posbiónicas combinadas.

Finalmente, se observó que el biofilm mixto (*Ca-Sm*) mantuvo una mayor biomasa residual tras el tratamiento, en comparación con los monocultivos. Este resultado valida la

teoría clásica propuesta por (Costerton et al., 1999) en su artículo seminal sobre la resistencia bacteriana, donde establecieron que la matriz de polisacáridos actúa como una barrera de difusión física. Estudios modernos como el de (Bowen et al., 2018) confirman que, en biofilms polimicrobianos, esta matriz crea microambientes ácidos que neutralizan o retienen a los agentes terapéuticos en la superficie. Por tanto, aunque *L. plantarum* es una herramienta potente, su aplicación clínica en caries severa o su uso como coadyuvante de la remoción mecánica para superar esta barrera estructural podría requerir concentraciones mayores. Por ello, es necesario continuar evaluando los efectos de distintos probióticos y sus combinaciones como una alternativa a procedimientos tradicionales.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, se concluye que el sobrenadante libre de células de *Lactobacillus plantarum* fue el tratamiento más efectivo evaluado en este estudio. Demostró una capacidad superior y consistente para reducir la biomasa en todos los escenarios propuestos, superando significativamente la efectividad de *Streptococcus salivarius*. Esto indica que los metabolitos producidos por esta cepa poseen un potencial inhibitorio frente a patógenos orales claves como *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, posicionándola como una excelente alternativa biológica.

Por otro lado, se confirmó que la interacción entre *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* genera una biopelícula mixta mucho más resistente y difícil de eliminar que las de especie única. A pesar de la eficacia mostrada por *Lactobacillus plantarum*, la cantidad de biomasa que permaneció en el grupo mixto fue mayor que en los monocultivos. Esto corrobora que la sinergia entre bacterias y hongos crea una estructura más compleja, lo que representa un desafío mayor para cualquier estrategia terapéutica y explica la persistencia de estas infecciones en la clínica.

Un hallazgo importante para destacar es que la combinación de los dos probióticos no mejoró los resultados; al contrario, el tratamiento mixto fue el menos eficaz de todos. Esto sugiere que, en lugar de potenciarse, existe una competencia o antagonismo entre *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus salivarius* cuando se cultivan juntos, lo que disminuye su poder inhibitorio. Por tanto, se desaconseja la mezcla de estas cepas sin estudios previos de compatibilidad.

Finalmente, desde un enfoque de Operatoria Dental y Estética, estos resultados validan el uso de posbióticos derivados de *Lactobacillus plantarum* como una estrategia

coadyuvante para el control del biofilm. Su aplicación podría ayudar a reducir el riesgo cariogénico y preservar la integridad de las interfaces adhesivas en restauraciones estéticas, ofreciendo una opción de tratamiento que modifica el ambiente oral a favor de la salud sin los efectos secundarios de los antimicrobianos tradicionales.

Referencias

- Aoki, H., Shiroza, T., Hayakawa, M., Sato, S., & Kuramitsu, H. K. (1986). Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. En *infection and immunity* (Vol. 53, Número 3). <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Banas, J. A. (2004). Virulence properties of *Streptococcus Mutans*. *Frontiers in bioscience*, 9(1–3), 1267. <https://doi.org/10.2741/1305>
- Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H., & Koo, H. (2018). Oral Biofilms: Pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. En *trends in microbiology* (Vol. 26, Número 3, pp. 229–242). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>
- Caufield, P. W., Cutter, G. R., & Dasanayake, A. P. (1993). Initial acquisition of *Mutans Streptococci* by infants: Evidence for a discrete window of infectivity. *Journal of dental research*, 72(1), 37–45. <https://doi.org/10.1177/00220345930720010501>
- Cheng, Y., Liu, J., & Ling, Z. (2022). Short-chain fatty acids-producing probiotics: A novel source of psychobiotics. En *critical reviews in food science and nutrition* (Vol. 62, Número 28, pp. 7929–7959). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1920884>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. En *Journal of clinical laboratory analysis* (Vol. 36, Número 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
- de Carvalho, F. G., Silva, D. S., Hebling, J., Spolidorio, L. C., & Spolidorio, D. M. P. (2006). Presence of *mutans streptococci* and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Archives of oral biology*, 51(11), 1024–1028. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.06.001>
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W.-H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
- Du, Q., Fu, M., Zhou, Y., Cao, Y., Guo, T., Zhou, Z., Li, M., Peng, X., Zheng, X., Li, Y., Xu, X., He, J., & Zhou, X. (2020). Sucrose promotes caries progression by disrupting the microecological balance in oral biofilms: an in vitro study. *Scientific reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59733-6>
- Falsetta, M. L., Klein, M. I., Colonne, P. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, C. H., Gonzalez-Begne, M., Watson, G., Krysan, D. J., Bowen, W. H., & Koo, H. (2014a). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infection and immunity*, 82(5), 1968–1981. <https://doi.org/10.1128/IAI.00087-14>

- Food and Agriculture Organization [FAO] & World Health Organization [WHO], 2001. (2006). *Probiotics in food : health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Food and agriculture organization of the United Nations : World Health Organization.
- Gönczi, N. N., Strang, O., Bagi, Z., Rákhely, G., & Kovács, K. L. (2021). Interactions between probiotic and oral pathogenic strains. *Biologia futura*, 72(4), 461–471. <https://doi.org/10.1007/s42977-021-00091-3>
- Gruner, D., Paris, S., & Schwendicke, F. (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. En *Journal of dentistry* (Vol. 48, pp. 16–25). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.002>
- Homayouni Rad, A., Pourjafar, H., & Mirzakhani, E. (2023). A comprehensive review of the application of probiotics and postbiotics in oral health. En *Frontiers in cellular and Infection Microbiology* (Vol. 13). Frontiers media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1120995>
- Hwang, G., Marsh, G., Gao, L., Waugh, R., & Koo, H. (2015). Binding force dynamics of *Streptococcus mutans* -glucosyltransferase B to *Candida albicans*. *Journal of dental research*, 94(9), 1310–1317. <https://doi.org/10.1177/0022034515592859>
- Inchingolo, A. D., Inchingolo, A. M., Palumbo, I., Guglielmo, M., Riccaldo, L., Morolla, R., Inchingolo, F., Palermo, A., & Dipalma, G. (2025). The role of probiotics in preventing dental caries: a systematic review of clinical evidence. En *Frontiers in oral health* (Vol. 6). Frontiers media SA. <https://doi.org/10.3389/froh.2025.1720036>
- Kim, H. E., Liu, Y., Dhall, A., Bawazir, M., Koo, H., & Hwang, G. (2021). Synergism of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* reinforces biofilm maturation and acidogenicity in saliva: An in vitro study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.623980>
- Lemos, J. A., & Burne, R. A. (2008). A model of efficiency: Stress tolerance by *Streptococcus mutans*. En *Microbiology* (Vol. 154, Número 11, pp. 3247–3255). <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/023770-0>
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. En *Microbiological reviews* (Vol. 50, Número 4).
- Luo, S. C., Wei, S. M., Luo, X. T., Yang, Q. Q., Wong, K. H., Cheung, P. C. K., & Zhang, B. B. (2024). How probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics prevent dental caries: an oral microbiota perspective. En *npj biofilms and microbiomes* (Vol. 10, Número 1). Nature research. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00488-7>
- Meurman, J. H., & Stamatova, I. (2007). Probiotics: contributions to oral health. *Oral diseases*, 13(5), 443–451. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01386.x>
- Milgrom, P. (2000). Tooth decay in our poorest children: what can we do? *Journal (indiana dental association)*, 79(4), 24–26.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1–4), 279–289.

- Parolin, C., Croatti, V., Laghi, L., Giordani, B., Tondi, M. R., De Gregorio, P. R., Foschi, C., & Vitali, B. (2021). Lactobacillus biofilms influence anti-candida activity. *Frontiers in microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750368>
- Poorni, S., Srinivasan, M., & Nivedhitha, M. (2019). Probiotic Streptococcus strains in caries prevention: A systematic review. *Journal of conservative dentistry*, 22(2), 123. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_505_18
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The international scientific association of probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. En *Nature reviews gastroenterology and hepatology* (Vol. 18, Número 9, pp. 649–667). Nature research. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Srivastava, N., Ellepola, K., Venkiteswaran, N., Chai, L. Y. A., Ohshima, T., & Seneviratne, C. J. (2020). Lactobacillus plantarum 108 inhibits streptococcus mutans and candida albicans mixed-species biofilm formation. *Antibiotics*, 9(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080478>
- Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2020). Probiotics in medicine: A long debate. En *Frontiers in immunology* (Vol. 11). Frontiers media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02192>
- Tagg, J. R. (2004). Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-Streptococcus pyogenes bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by Streptococcus salivarius. *The indian journal of medical research*, 119 Suppl, 13–16.
- Tagg, J. R., Harold, L. K., Jain, R., & Hale, J. D. F. (2023). Beneficial modulation of human health in the oral cavity and beyond using bacteriocin-like inhibitory substance-producing streptococcal probiotics. En *Frontiers in microbiology* (Vol. 14). Frontiers media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1161155>
- Zhang, Q., Qin, S., Xu, X., Zhao, J., Zhang, H., Liu, Z., & Chen, W. (2020). Inhibitory Effect of Lactobacillus plantarum CCFM8724 towards Streptococcus mutans - And Candida albicans -Induced caries in rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4345804>
- Zhu, M., Hao, C., Zou, T., Jiang, S., & Wu, B. (2025). Phage therapy as an alternative strategy for oral bacterial infections: a systematic review. En *BMC oral health* (Vol. 25, Número 1). BioMed central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12903-024-05399-9>