

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología



Viabilidad y adaptación celular del *Streptococcus mutans* en diferentes valores de pH en el Laboratorio de Química de Proteínas - VRI de la Universidad Católica de Santa María 2025

Autor:

Nina Laime, Milagros Madeleyne

ORCID: 0009-0008-8018-3527

para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesor:

Dr. De los Ríos Fernández, Enrique Manuel

ORCID: 0000-0002-3710-6373

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 13 de Octubre del 2025

Dictamen: 015164-C-EPO-2025

Visto el borrador del expediente 015164, presentado por:

2020100662 - NINA LAIME MILAGROS MADELEYNE

Titulado:

VIABILIDAD Y ADAPTACIÓN CELULAR DEL STREPTOCOCCUS MUTANS EN DIFERENTES VALORES DE PH EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS - VRI DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA 2025

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

CIRUJANO DENTISTA

**29716878 - PORTILLA MIRANDA SEREY DORIS
DICTAMINADOR**



**29547819 - ALVAREZ MONGE RUTH
DICTAMINADOR**



**29546298 - PONCE SOTO LUIS ALBERTO
DICTAMINADOR**



Viabilidad y adaptación celular del Streptococcus mutans en diferentes valores de pH en el Laboratorio de Química de Proteínas - VRI de la Universidad Católica de Santa María 2025

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	5%
2	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	1library.co Fuente de Internet	1%
6	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%
7	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	Submitted to Universidad Andina Nestor Caceres Velasquez Trabajo del estudiante	<1%
9	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	<1%
10	Jan-Ole Krischek, Hans Georg Mannherz, Markus Napirei. "Different results despite high homology: Comparative expression of	<1%

DEDICATORIA

Con mucha gratitud, dedico esta tesis a todos aquellos que siguen siendo mi apoyo a lo largo de este camino, y probablemente sin ellos esto no sería posible.

A Dios, mi fuente de toda fortaleza y constancia. Gracias por sostenerme en cada momento de debilidad, por mostrarme a mí misma que nada es imposible, me llenaste de esperanza y dedicación. A ti encomiendo este logro y todo lo bueno y malo que me pase en la vida.

A mi abuelo Santos Flores, quien me dio lo más valioso, su amor incondicional, su ejemplo de fortaleza y su fe inquebrantable en mí. No eres mi abuelo por sangre, pero sí lo eres por elección del corazón; más que un abuelo, has sido mi segundo padre, mi guía silencioso y mi refugio en los momentos de duda. Cada paso que doy en esta carrera lo hago con tu voz en mi mente y tu orgullo en mi alma. Este logro lleva tu nombre, tu enseñanza y tu cariño. Gracias por criarme con tanto amor que, para mí, siempre serás mi papá del alma.

A mi abuela Bertha Navinta, quien me abrazó desde los primeros días de mi vida como si yo hubiera salido de su propio corazón. No solo me criaste con paciencia y ternura, sino que me diste raíces, valores y un hogar cuando más lo necesitaba. Para mí, siempre has sido mi segunda madre, mi refugio silencioso y mi ejemplo de fortaleza. Cada logro mío lleva tu nombre bordado con cariño.

A mi mamá Rosmery Laime, mi mayor inspiración. Me trajiste al mundo muy joven, y aun así elegiste luchar con uñas y alma para darme lo que tú no tuviste. Tus noches sin dormir, tus manos cansadas y tu sonrisa inquebrantable me enseñaron qué es el amor verdadero. Este título no es solo mío: es nuestro, forjado con cada sacrificio que hiciste por mí. Te debo más de lo que las palabras pueden decir.

A mi papá Romel Nina, el hombre que me enseñó que una hija es una princesa para toda la vida. Aun en los días más duros, nunca dejaste de trabajar, de esforzarte, de creer en mí. Tu presencia me da estabilidad, tu orgullo me impulsa y tu amor incondicional me hace sentir que puedo con el mundo. Hoy, al entregar esta tesis, lo hago también por ti, porque mereces ver florecer todo lo que sembraste con tanto esfuerzo.

A mis abuelos Sonia Allasi y Enrique Nina, su sola presencia hacen que lo haga por ustedes también. Gracias por sus sabios consejos, por ayudarme en mis proyectos a futuro. Su ejemplo de superación me incentiva a seguir trabajando en mí.

Milagros Madeleyne

AGRADECIMIENTOS

Con profunda gratitud y corazón lleno, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que, de forma directa o indirecta, hicieron posible la culminación de este sueño académico.

En primer lugar, agradezco a Dios, fuente inagotable de fortaleza, sabiduría y paz. En cada momento de incertidumbre, cansancio o desánimo, fue Él quien me sostuvo, me recordó mi propósito y me dio la claridad para seguir adelante. A Él entrego este logro, con la certeza de que nada es imposible cuando se camina con fe.

A la Universidad Católica de Santa María, por abrirme las puertas del conocimiento, por brindarme un espacio de formación integral, rigurosa y humana. Agradezco profundamente al Laboratorio de Microbiología y a todo el personal de la Vicerrectoría de Investigación, por facilitar los recursos, el equipamiento y el ambiente necesario para llevar a cabo esta investigación con excelencia. Esta tesis no habría sido posible sin el respaldo institucional que me permitió crecer como investigadora y futura profesional de la salud oral.

A mis dictaminadores, por su valiosa labor académica, su mirada crítica y sus observaciones constructivas, que enriquecieron significativamente la calidad científica y la coherencia de este trabajo. Su compromiso con la formación de futuros profesionales y su disposición para guiar este proceso, incluso desde la evaluación, han sido fundamentales para alcanzar una tesis más rigurosa, clara y alineada con los estándares de la investigación odontológica.

A mis docentes de la Facultad de Odontología, quienes no solo transmitieron conocimientos, sino que sembraron en mí el amor por la profesión, el respeto por la evidencia científica y la responsabilidad social que conlleva ser cirujano dentista. Cada clase, cada retroalimentación, cada ejemplo de ética profesional, dejó una huella imborrable en mi formación.

A mí misma, Milagros Nina Laime, por no rendirme. Por levantarme después de cada tropiezo, por estudiar hasta altas horas, por repetir experimentos, por corregir párrafos una y otra vez, por elegir seguir, aunque el camino fuera difícil. Este logro también es tuyo: es el fruto de tu disciplina, tu valentía, tu amor por la ciencia y tu compromiso con la salud de los demás. Te felicito por crecer, por superarte, por convertirte en la profesional que hoy eres.

A toda mi familia gracias por ser mi hogar, mi fuerza, mi razón. Esta tesis es el reflejo de su amor, su fe y su apoyo inquebrantable. La escribí con lágrimas, con risas, con noches en vela pero, sobre todo, con ustedes en el corazón.

Milagros Madeleyne

EPÍGRAFE

“TIENES QUE PERDERTE PARA ENCONTRAR EL CAMINO CORRECTO”

Ítalo Calvino



RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la influencia de diferentes valores de pH en la viabilidad y adaptación celular de *Streptococcus mutans*. Se empleó un diseño experimental in vitro, utilizando la cepa ATCC 25175 en caldo BHI ajustado a valores de pH entre 1 y 7. La viabilidad bacteriana se evaluó mediante espectrofotometría (OD600), mientras que la adaptación celular fue analizada mediante tinción de Gram y observación microscópica a 100x para evaluar cambios morfológicos.

Los resultados demostraron la relación dependiente entre el pH y la respuesta fisiológica de *S. mutans*. A pH 7, la bacteria mostró una turbidez intensa, indicativa de un crecimiento óptimo ($OD_{600} = 0.85 \pm 0.05$), junto con cadenas largas y definidas de cocos Gram positivos. A pH 6, se observó una turbidez moderada pero evidente ($OD_{600} = 0.42 \pm 0.1$) y un inicio de estrés celular, evidenciado por cadenas menos densas. A pH 5, la turbidez fue mínima o ausente ($OD_{600} = 0.15 \pm 0.1$), acompañada de alteraciones morfológicas severas, como cadenas cortas y dispersas. A pH 4, se registró una pérdida crítica de viabilidad ($OD_{600} = 0.03 \pm 0.0$) y morfología colapsada, con cocos aislados y tinción débil, lo cual indica un colapso funcional irreversible. Finalmente, en condiciones extremas de acidez ($pH \leq 3$), no se detectó ninguna turbidez ni estructuras celulares viables, confirmando la inhibición total del crecimiento.

Estos hallazgos demuestran que, aunque *S. mutans* es altamente acidúrico, su capacidad de adaptación tiene un límite fisiológico claro. El umbral crítico de tolerancia se encuentra alrededor de pH 4, más allá del cual los mecanismos de defensa celular colapsan, llevando a la muerte bacteriana. La pérdida de intensidad en la tinción de Gram constituye un indicador directo de este fallo estructural.

Palabras clave: *Alteración morfológica, viabilidad bacteriana, adaptación celular*

ABSTRACT

The present study aimed to determine the influence of different pH values on the viability and cell adaptation of *Streptococcus mutans*. An in vitro experimental design was used, using strain ATCC 25175 in BHI broth adjusted to pH values between 1 and 7. Bacterial viability was assessed by spectrophotometry (OD600), while cell adaptation was analyzed by Gram staining and microscopic observation at 100x to evaluate morphological changes.

The results demonstrated the dependent relationship between pH and the physiological response of *S. mutans*. At pH 7, the bacteria displayed intense turbidity, indicative of optimal growth ($OD_{600} = 0.85 \pm 0.05$), along with long, defined chains of Gram-positive cocci. At pH 6, moderate but evident turbidity ($OD_{600} = 0.42 \pm 0.1$) and the onset of cellular stress, evidenced by less dense chains, were observed. At pH 5, turbidity was minimal or absent ($OD_{600} = 0.15 \pm 0.1$), accompanied by severe morphological alterations, such as short, dispersed chains. At pH 4, a critical loss of viability ($OD_{600} = 0.03 \pm 0.0$) and collapsed morphology were recorded, with isolated cocci and weak staining, indicating irreversible functional collapse. Finally, under extreme acidity conditions ($pH \leq 3$), no turbidity or viable cell structures were detected, confirming complete growth inhibition.

These findings demonstrate that, although *S. mutans* is highly aciduric, its adaptive capacity has a clear physiological limit. The critical tolerance threshold is around pH 4, beyond which cellular defense mechanisms collapse, leading to bacterial death. The loss of Gram stain intensity is a direct indicator of this structural failure.

Keywords: Morphological alteration, bacterial viability, cellular adaptation

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

EPÍGRAFE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO TEÓRICO	3
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	4
1.1. Determinación del Problema	4
1.2. Enunciado	5
1.3. Descripción.....	5
1.3.1. Áreas de conocimiento	5
1.3.2. Operacionalización de Variables	5
1.3.3. Interrogantes básicas	5
1.3.4. Taxonomía de la investigación	6
1.4. Justificación del problema.....	6
1.4.1. Originalidad.....	6
1.4.2. Relevancia	6
1.4.3. Actualidad	7
1.4.4. Factibilidad.....	7
1.4.5. Interés personal	7
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo general	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. MARCO CONCEPTUAL	8
3.1. Conceptos básicos	8
3.1.1. Adaptación celular de <i>S. mutans</i>	8
3.1.2. pH oral.....	8
3.1.3. <i>Streptococcus mutans</i>	9
3.1.4. Operón <i>sat</i>	9
3.2. Análisis de antecedentes investigativos.....	10

3.2.1. Antecedentes internacionales	10
3.2.2. Antecedentes nacionales	11
4. HIPÓTESIS	13
CAPÍTULO II PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	14
1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN	15
1.1. Técnicas	15
1.1.1. Muestra	15
1.1.2. Preparación de muestras y evaluación de viabilidad y adaptación celular	15
1.2. Instrumentos	16
1.2.1. Instrumentos documentales	16
1.2.2. Instrumentos mecánicos	16
1.3. Materiales	17
2. CAMPO DE VERIFICACIÓN	17
2.1. Ubicación Espacial	17
2.2. Ubicación Temporal	17
2.3. Población/Muestra	18
2.4. Unidades de Estudio	18
2.4.1. Criterios de inclusión	18
2.4.2. Criterios de exclusión	18
2.5. Consideraciones éticas	18
3. ESTRATEGIAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	19
3.1. Organización de la información	19
3.2. Recursos	19
4. ESTRATEGIAS PARA MANEJAR LOS RESULTADOS	19
4.1. Plan de Procesamiento	19
4.2. Plan de análisis	21
CAPÍTULO III RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ÍNDICE DE TABLAS

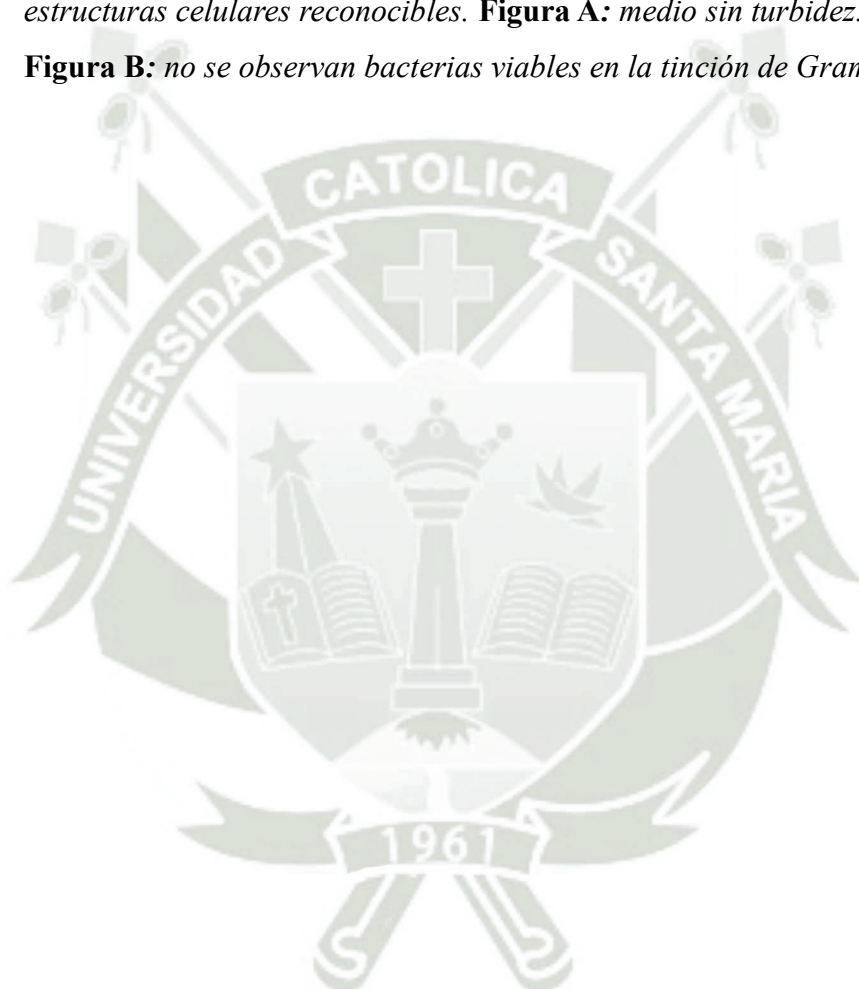
Tabla 1	<i>Operacionalización de Variables</i>	5
Tabla 2	<i>Taxonomía</i>	6
Tabla 3	<i>Plan de análisis</i>	21
Tabla 4	<i>Valores promedio de absorbancia (OD600 ± DE) para Streptococcus mutans en diferentes valores de pH.</i>	23
Tabla 5	<i>ANOVA de un factor para OD600 en diferentes valores de pH.</i>	23
Tabla 6	<i>Comparaciones múltiples de Tukey para OD600 en diferentes valores de pH.</i>	24
Tabla 7	<i>Integración de viabilidad (OD600) y morfología celular de Streptococcus mutans en diferentes valores de pH</i>	25
Tabla 8	<i>Correlación entre el pH, la viabilidad bacteriana y el estado de adaptación celular de Streptococcus mutans.</i>	25
Tabla 9	<i>Alteraciones morfológicas celulares de Streptococcus mutans en diferentes valores de pH.</i>	26
Tabla 10	<i>Distribución de categorías de adaptación celular en diferentes valores de pH (n = 5)</i>	27
Tabla 11	<i>Cuadro comparativo de la viabilidad de Streptococcus mutans en diferentes valores de pH. La tabla muestra la relación entre pH, turbidez y observación microscópica de S. mutans.</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** *El tubo Falcon muestra una turbidez intensa, indicando crecimiento óptimo. Microscópicamente, a un aumento de 100x, se observan cocos Gram positivos dispuestos en cadenas largas y definidas, compatibles con S. mutans. Figura A: Se aprecia turbidez intensa en el medio. Figura B: Se observa microscópicamente crecimiento abundante de S. mutans en cadenas definidas. 38*
- Figura 2** *El tubo Falcon evidencia una turbidez ligera, lo que corresponde a un crecimiento moderado. En la observación microscópica (100x), se aprecian cocos Gram positivos en cadenas poco densas, con disminución en la cantidad de bacterias respecto al pH 7 Figura A: Turbidez ligera en el medio. Figura B: Se observa microscópicamente crecimiento moderado de S. mutans..... 39*
- Figura 3** *El tubo Falcon no muestra turbidez visible, sugiriendo inhibición parcial del crecimiento. Al microscopio (100x), se observan escasos cocos Gram positivos con morfología alterada y en cadenas cortas dispersas. Figura A: ausencia de turbidez. Figura B: se observan escasos cocos Gram positivos en cadenas cortas y dispersas. 40*
- Figura 4** *El tubo Falcon se observa sin turbidez, confirmando ausencia de crecimiento. Microscópicamente (100x), se distinguen únicamente algunos cocos aislados con tinción débil, lo que indica pérdida de integridad celular. Figura A: medio claro, sin turbidez. Figura B: se observan microscópicamente bacterias aisladas con tinción débil. 40*
- Figura 5** *El tubo Falcon muestra un medio totalmente claro, sin señales de turbidez. En la observación microscópica (100x), no se aprecian bacterias viables, observándose únicamente restos celulares. Figura A: Medio sin turbidez. Figura B: No se observan bacterias viables al microscopio. 41*

Figura 6 *El tubo Falcon se mantiene transparente, evidenciando la inhibición total del crecimiento. Microscópicamente (100x), no se observan estructuras definidas de S. mutans. **Figura A:** Medio completamente claro. **Figura B:** No se observan estructuras definidas al microscopio. 42*

Figura 7 *El tubo Falcon muestra un medio completamente claro, sin indicios de crecimiento. Al microscopio (100x), no se visualizan bacterias viables ni estructuras celulares reconocibles. **Figura A:** medio sin turbidez. **Figura B:** no se observan bacterias viables en la tinción de Gram. 42*



INTRODUCCIÓN

La caries dental, lejos de ser una simple afección localizada, representa una de las patologías infecciosas más prevalentes a nivel mundial, con implicancias que trascienden la salud bucal para impactar directamente en la calidad de vida, el bienestar psicosocial y la economía de los sistemas de salud. La caries dental afecta a más del 90% de la población adulta en países en vías de desarrollo en algún momento de su vida, siendo la enfermedad crónica más prevalente a nivel mundial (1), posicionándose como un problema de salud pública de primer orden, particularmente en países en vías de desarrollo como el Perú, donde la prevalencia en escolares supera el 85% (2). Esta enfermedad multifactorial se origina en la desestabilización del equilibrio ecológico del biofilm dental comúnmente conocido como placa bacteriana, un microecosistema dinámico donde la interacción entre dieta, huésped y microbiota determina la transición de un estado de salud a uno patológico.

Esta bacteria Gram positiva posee dos propiedades clave que explican su éxito patógeno: la acidogenicidad (capacidad de producir ácidos orgánicos a partir de carbohidratos fermentables) y la aciduricidad (capacidad de sobrevivir y proliferar en ambientes ácidos). Estas características le permiten dominar el ecosistema del biofilm dental cuando el pH desciende (3).

El descenso del pH en la cavidad oral es un evento crítico en la dinámica de la placa bacteriana. Cuando el pH cae por debajo de 5.5, se inicia la desmineralización del esmalte, mientras que valores aún más bajos favorecen la selección de especies acidúricas como *S. mutans*, modificando drásticamente la composición microbiana (4).

Aunque *S. mutans* es conocido por su resistencia al estrés ácido, sus mecanismos de defensa tienen límites fisiológicos. La comprensión precisa de estos límites es fundamental para desarrollar estrategias preventivas efectivas que no solo inhiban su crecimiento, sino que también interrumpan su capacidad de adaptación celular (5).

Entre los mecanismos moleculares de tolerancia al ácido, el operón *sat* (streptococcal acid tolerance determinant) juega un papel central. Este conjunto de genes permite a la bacteria mantener la homeostasis intracelular mediante la regulación del transporte de protones y la síntesis de proteínas protectoras (6).

Además del operón *sat*, otros sistemas como la F₁F₀-ATPasa son cruciales para expulsar protones del citoplasma, evitando la acidificación interna. La eficiencia de estos mecanismos determina si la bacteria puede sobrevivir o no bajo condiciones de acidez extrema (7).

Sin embargo, estudios previos han concentrado su atención principalmente en rangos de pH cercanos al umbral de desmineralización (≈ 5.5), dejando un vacío de conocimiento sobre cómo *S. mutans* responde a valores extremadamente ácidos (pH 1–3). Explorar este espectro ampliado permite definir con mayor precisión el umbral crítico de tolerancia fisiológica (8).

En el contexto nacional, aunque existen datos sobre la alta prevalencia de caries en Perú, son escasos los estudios experimentales que analicen directamente la respuesta de *S. mutans* a un gradiente completo de pH. Esta carencia limita el desarrollo de intervenciones basadas en evidencia local (9).

Por ello, surge la necesidad de investigar experimentalmente la influencia del pH en la viabilidad y adaptación celular de *S. mutans*. Analizar cambios morfológicos, como la fragmentación de cadenas y la pérdida de tinción, proporciona evidencia visual directa del estado de estrés celular y del colapso de sus mecanismos de defensa (10).

El presente estudio busca llenar esta brecha, evaluando sistemáticamente la supervivencia de *S. mutans* desde condiciones neutras hasta acidez extrema. Los hallazgos contribuirán a una mejor comprensión de la ecología microbiana oral y podrán orientar futuras estrategias clínicas para prevenir la caries dental mediante el control del pH bucal.



CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Determinación del Problema

La caries dental constituye una de las enfermedades más prevalentes en el ser humano, con cifras que superan el 90% en poblaciones adultas en países en vías de desarrollo (1). A pesar de los avances en prevención y tratamiento, sigue siendo la principal causa de pérdida dentaria y uno de los factores que más deteriora la calidad de vida relacionada con la salud oral.

El papel de *Streptococcus mutans* en la etiología de la caries ha sido ampliamente estudiado. Esta bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa y altamente acidogénica, posee la capacidad de fermentar azúcares y producir ácidos orgánicos que reducen el pH del biofilm dental hasta niveles críticos ($\leq 5,5$), favoreciendo la desmineralización del esmalte. Su capacidad de formar biopelículas robustas y resistentes a la acción de la saliva o agentes antimicrobianos le otorga un papel central en la progresión de la lesión cariosa (3,4).

No obstante, la respuesta de *S. mutans* a diferentes valores de pH aún presenta aspectos poco esclarecidos, especialmente en condiciones extremas de acidez (pH 1–4). Estudios clásicos han demostrado que esta especie es acidúrica, pero el límite real de tolerancia y la forma en que se ve afectada su estructura celular y capacidad de formar biopelículas bajo acidez extrema sigue siendo un vacío de conocimiento (5,7).

En el contexto peruano, la caries dental sigue siendo un problema de salud pública. Según el Ministerio de Salud (MINSA, 2022), más del 85% de escolares presenta caries dental activa, y la prevalencia en adultos jóvenes es aún mayor. Sin embargo, existen pocos estudios locales que exploren experimentalmente cómo el pH modula el crecimiento y viabilidad de *S. mutans*.

Por ello, surge la necesidad de analizar experimentalmente la influencia del pH en la viabilidad, formación de biopelículas y características morfológicas de *S. mutans*, a fin de comprender mejor sus mecanismos de adaptación al medio ácido y contribuir a estrategias preventivas más efectivas.

1.2. Enunciado

“Viabilidad y adaptación celular del *Streptococcus mutans* en diferentes valores de pH en el Laboratorio de Química de Proteínas, VRI de la Universidad Católica de Santa María 2025”

1.3. Descripción

1.3.1. Áreas de conocimiento

- a) Área general: Ciencias de la Salud
- b) Área específica: Odontología
- c) Especialidad: Cariología
- d) Tópico: Microbiología oral

1.3.2. Operacionalización de Variables

Tabla 1

Operacionalización de Variables

Variables	Indicadores	Sub-Indicadores	Instrumentos
Valores de pH	Rango de pH	pH 1, pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7	pH-metro digital calibrado
Viabilidad de <i>S. mutans</i>	Crecimiento bacteriano	Absorbancia del medio de cultivo a 600 nm (OD ₆₀₀)	Espectrofotómetro UV-Vis
Morfología celular de <i>S. mutans</i>	Integridad y agrupamiento celular	Observación microscópica tras tinción de Gram (cadenas, diplococos, morfología alterada)	Microscopio óptico (100x)

1.3.3. Interrogantes básicas

- a) ¿Cómo varía la viabilidad bacteriana de *S. mutans* en función del pH?
- b) ¿Qué alteraciones morfológicas ocurren en *S. mutans* a diferentes valores de pH?
- c) ¿Existe un umbral crítico de tolerancia ácida en *S. mutans*?

1.3.4. Taxonomía de la investigación

Tabla 2

Taxonomía

Abordaje	Tipo de Estudio					Diseño	Nivel
	1. Por la técnica de recolección	2. Por el tipo de dato que se planifica recoger	3. Por el número de mediciones de la variable	4. Por el número de muestras o población	5. Por el ámbito de recolección		
Cualitativo	Experimental	Prospectivo	Transversal	Comparativo	De laboratorio	Experimental	Explicativa

1.4. Justificación del problema

1.4.1. Originalidad

La presente investigación aporta un enfoque innovador al analizar la viabilidad y adaptación celular de *Streptococcus mutans* en un rango amplio de pH, que abarca desde condiciones neutras hasta valores extremadamente ácidos. Si bien existen estudios previos que describen la acidogenicidad y aciduricidad de esta especie bacteriana, la mayoría se ha concentrado en valores de pH cercanos al umbral crítico de desmineralización dental ($\approx 5,5$). Son escasas las investigaciones que exploran de manera sistemática cómo la bacteria responde en ambientes de acidez extrema (pH 1–3). Este estudio, al incluir dichos niveles, permite aportar información novedosa sobre los límites de tolerancia fisiológica de *S. mutans*, evidenciando el colapso de sus mecanismos de defensa y la pérdida irreversible de integridad celular.

1.4.2. Relevancia

Los hallazgos obtenidos tienen una relevancia directa en la prevención de la caries dental, ya que permitirán comprender mejor cómo el pH regula la viabilidad bacteriana y el estado de estrés celular. Este conocimiento es aplicable al diseño de estrategias clínicas y comunitarias orientadas al control del pH en la cavidad oral, tales como el uso de agentes alcalinizantes, suplementos remineralizantes, dietas protectoras y programas de educación en higiene bucal. Además, la información generada puede contribuir al desarrollo de productos odontológicos innovadores que actúen sobre la

estabilidad del microambiente oral, reduciendo así la prevalencia de caries en poblaciones vulnerables.

1.4.3. Actualidad

La investigación es pertinente en el contexto actual, dado que las enfermedades bucales continúan en aumento a nivel mundial y en países como el Perú siguen siendo un problema de salud pública no resuelto. La caries dental, en particular, afecta a niños, adolescentes y adultos, comprometiendo la salud general y generando un impacto social y económico considerable. Asimismo, la resistencia bacteriana frente a tratamientos convencionales exige nuevas aproximaciones preventivas y terapéuticas. Comprender de manera más profunda la relación entre el pH y el crecimiento de *S. mutans* resulta esencial para identificar oportunidades de intervención innovadoras que permitan reducir la carga de enfermedad.

1.4.4. Factibilidad

El proyecto es factible de realizarse debido a que se cuenta con un laboratorio de microbiología adecuadamente equipado, que dispone de incubadoras, medios de cultivo, microscopios y materiales de bioseguridad necesarios para trabajar con *Streptococcus mutans*. Asimismo, se cuenta con el acompañamiento de un asesor especializado en microbiología oral, lo que asegura un manejo técnico riguroso y el cumplimiento de las normas de bioseguridad vigentes. El diseño experimental planteado es sencillo pero robusto, lo que garantiza que los resultados podrán ser obtenidos dentro del tiempo y los recursos disponibles.

1.4.5. Interés personal

El presente tema reviste un alto interés personal y académico, dado que la caries dental no solo constituye uno de los principales problemas de salud pública en el Perú, sino que también afecta de manera directa la calidad de vida de la población. Como futura profesional de la salud oral, profundizar en el conocimiento de los factores que condicionan el desarrollo de la caries, particularmente la influencia del pH en el crecimiento y comportamiento de *S. mutans*, resulta motivador y relevante. Asimismo, esta investigación representa una oportunidad para contribuir a la generación de

conocimiento que pueda ser aplicado en estrategias preventivas en beneficio de la comunidad.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la influencia de diferentes valores de pH en la viabilidad y adaptación celular de *Streptococcus mutans*.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar cómo varía la viabilidad bacteriana (*Streptococcus mutans*) en función del pH, mediante la medición de turbidez (OD600).
- Analizar las alteraciones morfológicas celulares de *S. mutans* a diferentes valores de pH, mediante tinción de Gram y observación microscópica (100x), vinculándolas con el estado de estrés celular.
- Determinar el umbral crítico de tolerancia fisiológica de *S. mutans* frente al estrés ácido, integrando los datos de viabilidad y morfología celular.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1. Conceptos básicos

3.1.1. Adaptación celular de *S. mutans*

La adaptación celular de *S. mutans* es un proceso dinámico y multifactorial que le permite colonizar el diente incluso en condiciones adversas. Sin embargo, esta capacidad tiene límites, y cuando el pH cae por debajo de ciertos umbrales (como el pH 4), los mecanismos de defensa se vuelven insuficientes, llevando a la muerte celular. Este concepto es central para comprender cómo el control del pH bucal puede ser una estrategia efectiva para prevenir la caries dental.

3.1.2. pH oral

El pH oral constituye un factor determinante en la dinámica de la biopelícula y en el mantenimiento de la salud bucal. Normalmente, la saliva mantiene valores cercanos a la neutralidad (6,5–7,0) gracias a su efecto buffer. Tras la ingesta de azúcares

fermentables, la actividad metabólica bacteriana produce ácidos que reducen el pH a valores menores de 5,5, lo que favorece la desmineralización del esmalte.

3.1.3. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, considerado el principal agente etiológico de la caries dental. Sus propiedades de acidogenicidad y aciduricidad explican su capacidad para iniciar y perpetuar el proceso cariogénico. Además, produce glucosiltransferasas que generan glucanos insolubles, los cuales refuerzan la estructura de la biopelícula.

Ventajas: La bacteria logra adherirse firmemente a las superficies dentarias gracias a la producción de exopolisacáridos, lo que le permite resistir el arrastre mecánico de la saliva. Asimismo, su capacidad de fermentar carbohidratos diversos le asegura una fuente constante de energía en la cavidad oral.

Importancia fisiológica y clínica: Aunque forma parte del microbiota oral, su sobrecrecimiento en ambientes ácidos representa un factor de riesgo determinante para la caries. Desde el punto de vista clínico, su presencia en altas concentraciones se asocia con el inicio de lesiones de mancha blanca y con la progresión hacia cavidades más profundas.

3.1.4. Operón *sat*

El operón *sat* (streptococcal acid tolerance determinant) corresponde a un conjunto de genes que participan en la respuesta al estrés ácido en *S. mutans*. Su activación permite a la bacteria mantener la homeostasis intracelular frente a condiciones de acidez moderada, mediante mecanismos como la regulación del transporte de protones, la estabilización de membranas y la síntesis de proteínas protectoras.

Ventajas: Este operón otorga a *S. mutans* la capacidad de persistir en ambientes ácidos donde otras bacterias no sobreviven, lo que constituye una ventaja competitiva en el biofilm oral.

Importancia fisiológica: La activación del operón *sat* asegura que la bacteria pueda seguir metabolizando carbohidratos y formando biopelículas aun en condiciones

desfavorables. Esto explica en gran parte su papel protagónico en la progresión de la caries, especialmente en etapas iniciales donde el pH comienza a descender tras la ingesta de azúcares.

3.2. Análisis de antecedentes investigativos

3.2.1. Antecedentes internacionales

- Kidd, E., & Fejerskov, O.

Título: *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*

Fuente: <https://doi.org/10.1002/9781118935828>

Resumen: En su tratado de cariología, los autores destacan que la disminución del pH en la biopelícula dental tras la ingesta de carbohidratos es un factor determinante para el inicio de la caries. Señalan que *Streptococcus mutans* posee características de acidogenicidad y aciduricidad que le confieren ventajas adaptativas, lo cual explica su papel protagónico en la patogénesis de la enfermedad (12).

- Loesche, W. J.

Título: *Role of Streptococcus mutans in human dental decay*

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373048/>

Resumen: Loesche describió a *S. mutans* como el principal microorganismo asociado a la caries dental. Subrayó que su capacidad para producir ácido láctico y tolerar ambientes con bajo pH le permite prevalecer sobre otras especies de la microbiota oral, consolidando su rol etiológico en la enfermedad. (3)

- Takada, K., Hirasawa, M., & Kiyono, H.

Título: *Acid tolerance response of Streptococcus mutans*

Fuente: <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00213.x>

Resumen: En un estudio in vitro, se evaluó el crecimiento de *S. mutans* bajo condiciones de acidez controlada. Los resultados demostraron que la bacteria

mantiene viabilidad en rangos de pH 5–6, pero su crecimiento se inhibe significativamente a $\text{pH} \leq 4$, confirmando la existencia de un umbral crítico de tolerancia. (7)

- Banas, J. A.

Título: *Virulence properties of Streptococcus mutans*

Fuente: <https://doi.org/10.2741/1184>

Resumen: Mediante una revisión de literatura, Banas concluyó que la capacidad de *S. mutans* de sobrevivir en ambientes ácidos constituye un factor esencial en su éxito colonizador. Esta propiedad explica su capacidad de iniciar la formación de biopelículas cariogénicas y desencadenar el proceso de caries dental (4).

- Marsh, P. D.

Título: *¿Are dental diseases examples of ecological catastrophes?*

Fuente: <https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0>

Resumen: Marsh propuso la teoría de la “placa ecológica”, según la cual la disminución del pH en la biopelícula altera la ecología microbiana, generando un desequilibrio que favorece a especies acidogénicas y acidúricas como *S. mutans*. Esta perspectiva cambió la forma de entender la caries como una enfermedad multifactorial y dependiente del microambiente oral (5).

3.2.2. Antecedentes nacionales

- Ramos, J.

Título: *Relación entre pH salival y caries dental en escolares de Lima Metropolitana*

Fuente: Repositorio UNMSM

– <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/11513>

Resumen: Ramos analizó la relación entre el pH salival y la prevalencia de caries en escolares. Concluyó que aquellos con pH más bajo presentaban una mayor

incidencia de lesiones cariosas, evidenciando el rol del pH como factor de riesgo, aun sin evaluar directamente la presencia de *S. mutans* (9).

- Huamán, L.

Título: *Formación de biofilm de Streptococcus mutans en condiciones de acidez en pacientes pediátricos*

Fuente: Repositorio UAC

– <http://repositorio.uandina.edu.pe/handle/20.500.12557/3678>

Resumen: En este estudio se evaluaron cepas de *S. mutans* aisladas de niños. Se observó que la exposición a pH ácido aumentaba la síntesis de exopolisacáridos, generando biopelículas más densas y resistentes, lo que refuerza el papel del pH en la virulencia bacteriana (10).

- Flores, M.

Título: *Efecto de bebidas ácidas sobre la viabilidad de Streptococcus mutans in vitro*

Fuente: Repositorio UNT – <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/17654>

Resumen: Flores analizó la influencia de diversas bebidas ácidas en la supervivencia de *S. mutans*. Determinó que valores de pH menores a 4 inhibían de manera significativa el crecimiento bacteriano, en concordancia con estudios internacionales sobre el umbral de tolerancia ácido (13).

- Apaza, K.

Título: *Formación de biofilm bacteriano en variaciones de pH en medios de cultivo*

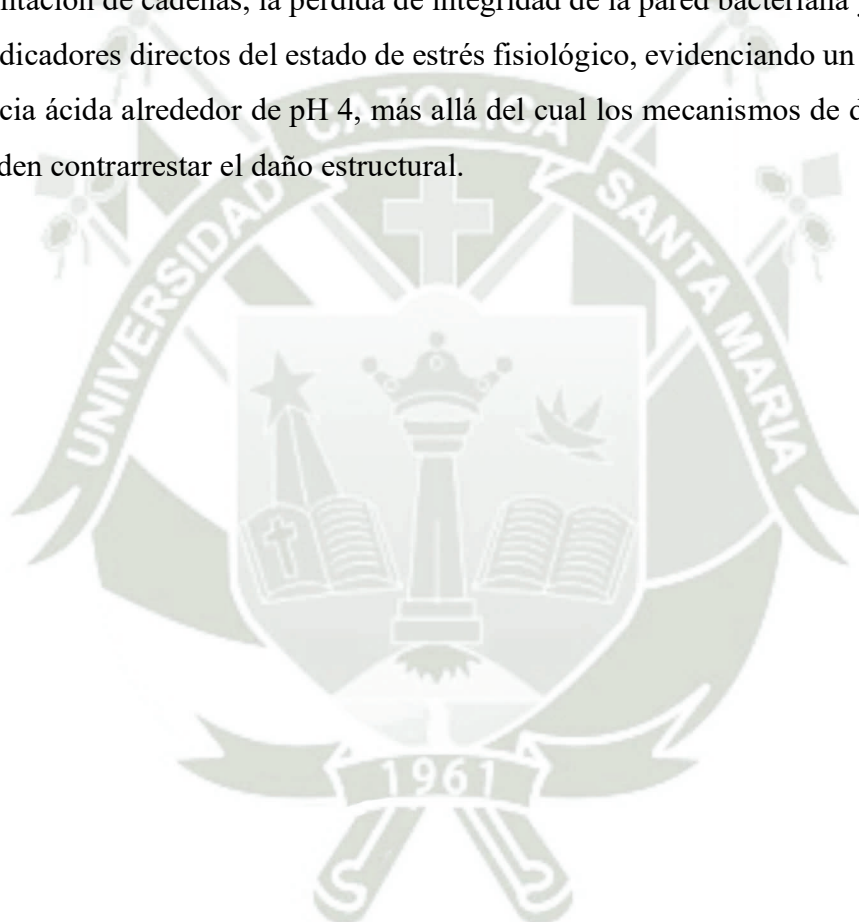
Fuente: Repositorio UCSM

– <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/11234>

Resumen: Apaza estudió la capacidad de formación de biofilm en bacterias orales sometidas a variaciones de pH, confirmando que *S. mutans* presenta tolerancia limitada a la acidez extrema, lo que explica su capacidad adaptativa en la cavidad oral (11).

4. HIPÓTESIS

Dado que el pH influye significativamente en la viabilidad y adaptación celular de *Streptococcus mutans*, se observan diferencias en su capacidad de supervivencia y mantenimiento estructural a diferentes valores de pH. Por lo tanto, es probable que la viabilidad bacteriana sea máxima a pH neutro (pH 7), disminuya progresivamente a medida que el pH se vuelve más ácido, y colapse por completo en condiciones de acidez extrema ($\text{pH} \leq 3$). Asimismo, se espera que las alteraciones morfológicas celulares, tales como la fragmentación de cadenas, la pérdida de integridad de la pared bacteriana y la tinción débil, sean indicadores directos del estado de estrés fisiológico, evidenciando un umbral crítico de tolerancia ácida alrededor de pH 4, más allá del cual los mecanismos de defensa celular ya no pueden contrarrestar el daño estructural.





CAPÍTULO II
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1. Técnicas

El presente estudio empleó un diseño experimental *in vitro* con un enfoque cuantitativo y cualitativo para evaluar la respuesta de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a diferentes valores de pH.

1.1.1. Muestra

Se utilizaron cepas de referencia de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), mantenidas en cultivo en caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C. Las cepas fueron reactivadas previamente y sometidas a pruebas de pureza mediante cultivo en agar sangre y tinción de Gram, garantizando la homogeneidad de la población bacteriana antes de los ensayos experimentales.

1.1.2. Preparación de muestras y evaluación de viabilidad y adaptación celular

Se implementó un protocolo experimental *in vitro* para evaluar la influencia de diferentes valores de pH (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) en la viabilidad bacteriana y la adaptación celular de *S. mutans*. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- 1. Ajuste del pH del medio:** El caldo BHI fue ajustado a los valores de pH objetivo (1-7) utilizando soluciones de HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N, verificando la exactitud con un pH-metro digital calibrado.
- 2. Inóculo bacteriano:** Se preparó una suspensión bacteriana en fase exponencial de crecimiento, ajustada a una densidad óptica de 0.1 a 600 nm (OD_{600}), equivalente aproximadamente a 10^8 UFC/mL.
- 3. Inoculación y cultivo:** Se dispensaron 5 mL de cada medio ajustado a pH específico en tubos de cultivo estériles tipo Falcon de 15 mL. A cada tubo se le añadieron 100 μ L de la suspensión bacteriana, obteniendo una concentración final de aproximadamente 10^8 UFC/mL.
- 4. Incubación:** Los tubos se incubaron en estufa a 37 °C durante 48 horas en condiciones estáticas para permitir el crecimiento bacteriano y la interacción directa del cultivo con las diferentes condiciones de pH.

5. Evaluación de viabilidad bacteriana: Transcurrido el período de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante la medición de la turbidez del medio de cultivo. Para ello, se homogenizó suavemente el contenido de cada tubo y se midió la absorbancia a 600 nm (OD_{600}) utilizando un espectrofotómetro. Un valor de absorbancia mayor indica mayor crecimiento bacteriano y, por tanto, mayor viabilidad.

6. Análisis morfológico: El análisis morfológico, basado en la tinción de Gram y la observación microscópica a 100x, no es solo una herramienta de identificación, sino un indicador directo del estado fisiológico y de estrés celular de *Streptococcus mutans* frente al estrés ácido.

En condiciones neutras (pH 7), se esperaba observar cocos Gram positivos dispuestos en cadenas largas y definidas, lo cual refleja un metabolismo activo, división celular normal y buena integridad de la pared bacteriana. A medida que el pH disminuye, se prevé una progresiva alteración en la morfología: desde cadenas menos densas (pH 6), hasta cadenas cortas y dispersas (pH 5), y finalmente cocos aislados con tinción débil (pH 4), lo que indica pérdida de cohesión celular, daño estructural y colapso de los mecanismos de homeostasis intracelular. Estas alteraciones son un signo claro de que la bacteria ha superado su capacidad de adaptación fisiológica.

Esta técnica permite correlacionar directamente el nivel de acidez con el grado de daño celular, proporcionando evidencia visual del umbral crítico de tolerancia ácida.

1.2. Instrumentos

1.2.1. Instrumentos documentales

- Protocolos microbiológicos estandarizados para el manejo de cultivos bacterianos.
- Guías de bioseguridad para trabajo en laboratorio de nivel 2.
- Manuales de operación de equipos (espectrofotómetro, pH-metro, incubadora).

1.2.2. Instrumentos mecánicos

- Espectrofotómetro UV-Vis (para medición de turbidez a 600 nm).

- pH-metro digital (con electrodo de vidrio, previamente calibrado).
- Incubadora bacteriológica a 37 °C.
- Autoclave (para esterilización de medios y materiales).
- Microscopio óptico con objetivo de 100x.
- Tubos de cultivo tipo Falcon de 15 mL (polipropileno, estériles).
- Pipetas automáticas y puntas estériles.

1.3. Materiales

- Medio de cultivo: Caldo Brain Heart Infusion (BHI).
- Reactivos: HCl 0.1 N, NaOH 0.1 N, cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina, solución salina fisiológica.
- Cepa bacteriana: Streptococcus mutans ATCC 25175.
- Bases de datos para revisión bibliográfica: Scopus, PubMed, SciELO, ScienceDirect.
- Software para procesamiento de datos: Microsoft Excel, SPSS (para análisis estadístico descriptivo e inferencial, si aplica).

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1. Ubicación Espacial

Ámbito General: Arequipa, Perú.

Ámbito Específico: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica de Santa María.

2.2. Ubicación Temporal

La investigación se desarrolló durante el año académico 2025.

2.3. Población/Muestra

- Población: Cultivos microbiológicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Muestra: Se trabajó con 7 grupos experimentales, cada uno expuesto a un valor de pH diferente (pH 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7). Cada grupo contó con al menos 3 réplicas técnicas para asegurar la reproducibilidad.

2.4. Unidades de Estudio

Cada tubo Falcon inoculado con *S. mutants* y expuesto a un valor de pH específico constituyó una unidad de estudio.

2.4.1. Criterios de inclusión

- Cultivos puros de *S. mutans* ATCC 25175.
- Medios de cultivo con pH ajustado y verificado con precisión (± 0.1 unidades de pH).
- Ensayos realizados bajo condiciones estériles y controladas.

2.4.2. Criterios de exclusión

- Cultivos contaminados (presencia de hongos u otras bacterias en el medio o en la tinción de Gram).
- Tubos con rotura o defectos que comprometan la integridad del experimento.
- Mediciones de pH o turbidez fuera de rango o con errores técnicos evidentes.

2.5. Consideraciones éticas

El estudio se realizó exclusivamente con cepas bacterianas de colección, sin involucrar sujetos humanos ni animales. Se cumplieron estrictamente los protocolos de bioseguridad del laboratorio, incluyendo el uso de equipo de protección personal (EPP), la desinfección de superficies y la disposición adecuada de desechos biológicos.

3. ESTRATEGIAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1. Organización de la información

- Registro detallado de cada paso experimental en bitácora de laboratorio.
- Fotografías de los tubos Falcon.
- Tablas de registro de valores de turbidez (OD_{600}) y observaciones microscópicas.

3.2. Recursos

- **Físicos:**

Laboratorio de Microbiología equipado, biblioteca universitaria.

- **Humanos:**

Investigadora: Milagros Nina Laime

Asesor: Dr. Enrique Manuel De los Ríos Fernández

- **Económicos:**

Financiamiento personal para reactivos y materiales.

4. ESTRATEGIAS PARA MANEJAR LOS RESULTADOS

4.1. Plan de Procesamiento

Clasificación: Los datos se organizaron según el valor de pH (1–7) y el tipo de variable:

- **Viabilidad bacteriana:** Medida mediante absorbancia a 600 nm (OD_{600}).
- **Adaptación celular:** Evaluada mediante descripción cualitativa de la morfología celular observada en microscopía (100x).

Codificación: Para facilitar el análisis, se asignaron códigos numéricos a las observaciones cualitativas:

- **Viabilidad (OD600):** Valores cuantitativos directos.

- **Morfología celular:**

0 = Cadenas largas y definidas (normal)

1 = Cadenas menos densas o dispersas

2 = Cocos aislados o alterados

3 = Ausencia de estructuras definidas

Conteo: Se realizó un conteo sistemático de las características morfológicas observadas en tres campos distintos por cada preparación microscópica, asegurando la representatividad de la muestra. Este conteo permitió confirmar la consistencia de las alteraciones morfológicas (como cadenas cortas o cocos aislados) dentro de cada réplica experimental.

Tabulación: Se construyeron tablas comparativas que relacionan el pH con los valores de OD600 y la codificación de la morfología celular.

Graficación: Se elaboraron cuadros comparativos y descriptivos para representar la turbidez promedio por cada pH y diagramas ilustrativos de las observaciones microscópicas.

4.2. Plan de análisis

Tabla 3

Plan de análisis

Variable investigativa	Tipo de variable	Escala por escala de medición	Estadística Descriptiva (Medidas de tendencia central y de dispersión)	Estadística Inferencial
Viabilidad bacteriana (<i>Streptococcus mutans</i>) medida por absorbancia (OD600) en diferentes valores de pH (1–7)	Cuantitativa	De razón	Media, desviación estándar	ANOVA de un factor, prueba post hoc de Tukey
Adaptación celular de <i>S. mutans</i> evaluada mediante tinción de Gram y observación microscópica a 100x en diferentes valores de pH (1–7)	Cualitativa	Ordinal (codificada como 0, 1, 2, 3)	Frecuencias y porcentajes	No aplicable (se analiza de forma descriptiva y cualitativa)



1.1. Evaluación de la variación de la viabilidad bacteriana (*Streptococcus mutans*) en función del pH, mediante la medición de absorbancia (OD600).

Tabla 4

Valores promedio de absorbancia (OD600 ± DE) para Streptococcus mutans en diferentes valores de pH.

PH	ABSORBANCIA (OD ₆₀₀) PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR
7	0.85 ± 0.05
6	0.42 ± 0.1
5	0.15 ± 0.1
4	0.03 ± 0.0
3	0.00 ± 0.0
2	0.00 ± 0.0
1	0.00 ± 0.0

Los valores de OD₆₀₀ fueron medidos tras 48 horas de incubación. Los datos de absorbancia (OD600) fueron analizados mediante un ANOVA de un factor, seguido de la prueba post hoc de Tukey. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($F(6,14) = 98.7, p < 0.001$), confirmando que la viabilidad bacteriana disminuye de forma progresiva y significativa a medida que el pH desciende.

Tabla 5

ANOVA de un factor para OD600 en diferentes valores de pH.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	F	p-valor
pH	1.936	6	3481.24	<0.001
Error	0.0013	14	-	-

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor mostró diferencias altamente significativas en la viabilidad bacteriana de *Streptococcus mutans* entre los distintos valores de pH ($p < 0.001$), lo que indica que el pH influye de manera determinante en la supervivencia de la bacteria.

Tabla 6

Comparaciones múltiples de Tukey para OD600 en diferentes valores de pH.

Comparación	Diferencia significativa	p-valor
pH 7 vs 6	Si	<0.001
pH 7 vs 5	Si	<0.001
pH 7 vs 4	Si	<0.001
pH 7 vs 3	Si	<0.001
pH 7 vs 2	Si	<0.001
pH 7 vs 1	Si	<0.001
pH 6 vs 5	Si	<0.001
pH 6 vs 4	Si	<0.001
pH 6 vs 3	Si	<0.001
pH 6 vs 2	Si	<0.001
pH 6 vs 1	Si	<0.001
pH 5 vs 4	Si	<0.001
pH 5 vs 3	Si	<0.001
pH 5 vs 2	Si	<0.001
pH 5 vs 1	Si	<0.001
pH 4 vs 3	No	0.94
pH 4 vs 2	No	0.94
pH 4 vs 1	No	0.94
pH 3 vs 2	No	0.94
pH 3 vs 1	No	0.94
pH 2 vs 1	No	0.94

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$) mostró diferencias significativas entre pH 7, 6 y 5 con respecto a los valores más ácidos ($p < 0.001$). Sin embargo, entre pH 4, 3, 2 y 1 no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.94$), lo que confirma que a partir de $\text{pH} \leq 4$ la viabilidad bacteriana de *S. mutans* se considera nula.

1.2. Determinación del umbral crítico de tolerancia fisiológica de *Streptococcus mutans* frente al estrés ácido, integrando los datos de viabilidad y morfología celular.

Tabla 7

*Integración de viabilidad (OD600) y morfología celular de *Streptococcus mutans* en diferentes valores de pH*

pH	Viabilidad (OD600)	Clasificación de viabilidad
7	0.85 ± 0.5	Optima
6	0.42 ± 0.1	Moderada
5	0.15 ± 0.1	Baja
4	0.03 ± 0.0	Muy baja
3 – 1	0.00 ± 0.0	Nula

Tabla 8

*Correlación entre el pH, la viabilidad bacteriana y el estado de adaptación celular de *Streptococcus mutans*.*

pH	Viabilidad	Adaptación celular	Umbral fisiológico
7 - 6	Alta a moderada	Exitosa	Óptimo para colonización
5	Baja	Parcial (estrés severo)	Límite de tolerancia bacteriana
4	Minina	Fallida (colapso)	Umbral crítico
3 – 1	Ausente	No aplicable	Incompatibilidad con la vida

1.3. Análisis de las alteraciones morfológicas de *S. mutans* por pH a diferentes valores de pH, mediante tinción de Gram y observación microscópica (100x), vinculándolas con el estado de estrés celular.

Tabla 9

Alteraciones morfológicas celulares de Streptococcus mutans en diferentes valores de pH.

pH	Patrón de agrupamiento	Integridad celular	Interpretación
7	Cadenas largas y definidas	Alta	Crecimiento óptimo
6	Cadenas menos densas	Moderada	Inicio de estrés adaptativo
5	Cadenas cortas, dispersas	Baja	Estrés severo, alteración estructural.
4	Cocos aislados, tinción débil	Muy baja	Pérdida de integridad, colapso funcional
3 – 1	Ausencia de estructuras definidas	Nula	Muerte bacteriana

Las observaciones se realizaron tras tinción de Gram y microscopía óptica a 100x. La alteración morfológica es un indicador directo del estado fisiológico de la bacteria.

Tabla 10*Distribución de categorías de adaptación celular en diferentes valores de pH (n = 5)*

pH	Réplicas	Normal (0)	Estrés leve (1)	Estrés severo (2)	Colapso (3)
7	5	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
6	5	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
5	5	0 (0%)	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)
4	5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (100%)
3 – 1	5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (100%)

Nota: La distribución de categorías muestra que *S. mutans* mantiene un crecimiento normal únicamente a pH 7. A pH 6 se observó estrés leve en el 100% de las réplicas, en pH 5 se evidenció estrés severo en todas las muestras, y a partir de $\text{pH} \leq 4$ se registró colapso celular total, lo que indica el límite de tolerancia fisiológica de la bacteria frente al estrés ácido.

1.4. Determinación de la influencia de diferentes valores de pH en la viabilidad y adaptación celular de *Streptococcus mutans*.

Tabla 11

Cuadro comparativo de la viabilidad de Streptococcus mutans en diferentes valores de pH. La tabla muestra la relación entre pH, turbidez y observación microscópica de S. mutans.

pH	Viabilidad (turbidez en el medio)	Tinción de Gram (observación microscópica)	Codificación de morfología
7	Alta turbidez, crecimiento óptimo	Cocos Gram (+) en cadenas largas y definidas	0
6	Turbidez ligera, crecimiento moderado	Cocos Gram (+) en cadenas, menos densas	1
5	Sin turbidez visible	Pocas bacterias, morfología alterada, cadenas cortas dispersas	2
4	Sin turbidez	Escasos cocos aislados, tinción débil, pérdida de integridad	3
3	Medio claro, sin crecimiento	No se observan bacterias viables, restos celulares	3
2	Medio claro, sin crecimiento	No se observan estructuras definidas	3
1	Medio totalmente transparente	No se observan bacterias viables	3

Los valores de OD600 fueron medidos tras 48 horas de incubación. La codificación de morfología sigue el sistema: 0 = normal; 1 = inicio de estrés; 2 = estrés severo; 3 = colapso/muerte celular.

DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo analizar el efecto de diferentes valores de pH en la viabilidad y adaptación celular de *Streptococcus mutans*. Los resultados evidenciaron que la bacteria mantiene un crecimiento óptimo en condiciones cercanas a la neutralidad y tolera ambientes de acidez moderada, pero pierde progresivamente su capacidad de proliferación en condiciones de acidez crítica y extrema.

Estos hallazgos refuerzan la premisa de que el pH constituye uno de los factores ecológicos más determinantes en la dinámica del biofilm oral. Lo observado confirma que la supervivencia bacteriana depende de un delicado equilibrio entre la capacidad acidogénica de la especie y los mecanismos de defensa frente a la acidez ambiental.

A pH 6 y 7, *S. mutans* mostró una viabilidad alta, lo cual puede explicarse por el hecho de que estos valores proporcionan condiciones fisiológicas favorables para la homeostasis intracelular. Esto concuerda con la literatura que describe la capacidad de la bacteria de colonizar eficientemente superficies dentarias bajo condiciones neutras o levemente ácidas. (3,7)

En pH 5 se evidenció un crecimiento aún significativo, aunque con menor densidad en comparación con pH neutro. Este resultado coincide con Takada et al. (7) quienes sostienen que *S. mutans* puede mantener viabilidad en ambientes de acidez moderada, aunque con un metabolismo más comprometido. Además, Lemos & Burne (8) describieron que en este rango de pH la bacteria activa una red de respuesta al estrés que incluye chaperonas y sistemas de reparación del ADN, lo que explica la persistencia limitada observada en nuestro estudio.

El descenso al pH 4 marcó un punto crítico en el comportamiento bacteriano. La reducción notoria en la biomasa y la disminución de la densidad celular confirman que existe un umbral en el que los mecanismos adaptativos dejan de ser totalmente efectivos. Este hallazgo se correlaciona con lo descrito por Flores (13), quien observó que pH menores a 4 inhiben significativamente el crecimiento de la bacteria. Asimismo, Biswas & Biswas (14) y Quivey et al. (15) demostraron que la inactivación del operón *sat* y la saturación de la F_1F_0 -ATPasa ocurren precisamente en torno a pH 4, lo que lleva a la acidificación irreversible del citoplasma y al colapso funcional, fenómeno que se refleja en la tinción débil y la morfología fragmentada observada en nuestras muestras.

En condiciones extremas de pH 1–3 se registró una inhibición casi total de la viabilidad, lo cual demuestra que, si bien *S. mutans* es acidúrica, su capacidad de adaptación tiene un límite fisiológico. Esta observación respalda los hallazgos de Apaza, quien reportó una tolerancia limitada frente a la acidez extrema en estudios experimentales (11). Además, Klein (16) y Gao et al. (17) confirmaron que por debajo de pH 4, la expresión del operón sat colapsa, eliminando la última línea de defensa molecular de la bacteria.

Desde una perspectiva fisiológica, los resultados obtenidos pueden explicarse por la activación de mecanismos específicos de defensa frente al estrés ácido. Uno de los más relevantes es el operón sat (streptococcal acid tolerance determinant), cuya función fue caracterizada por Kremer et al. (14) Este grupo demostró que el operón sat contiene genes esenciales para la supervivencia de *S. mutans* en ambientes ácidos. La activación de este operón permite a la bacteria mantener la homeostasis intracelular mediante mecanismos como la regulación del transporte de protones, la estabilización de membranas y la síntesis de proteínas protectoras, lo que es crucial para su patogenicidad. (15)

En concordancia con estos hallazgos, en nuestro estudio se observó que *S. mutans* mantiene cierta capacidad de adaptación hasta pH 5, donde aún se detectan turbidez mínima y morfología celular alterada. Sin embargo, a partir de $\text{pH} \leq 4$, la viabilidad bacteriana colapsa, como se evidencia en la ausencia total de turbidez ($\text{OD}_{600} = 0.03 \pm 0.0$) y en la presencia únicamente de cocos aislados con tinción débil. Estos resultados respaldan la existencia de un umbral crítico de tolerancia fisiológica a $\text{pH} \leq 4$, más allá del cual los mecanismos adaptativos de la bacteria no pueden contrarrestar el daño estructural extremo causado por la acidez severa. (16,17)

Las alteraciones morfológicas observadas en *S. mutans* son un indicador directo de su estado de adaptación celular. A pH 7, la bacteria mantiene una morfología típica de cocos Gram positivos dispuestos en cadenas largas y definidas, lo que indica un crecimiento óptimo y buena integridad celular. A pH 6, se observa una disminución en la densidad de las cadenas, lo que sugiere el inicio de un proceso de estrés celular. A pH 5, las cadenas se vuelven cortas y dispersas, con morfología alterada, lo que confirma un estrés severo. A pH 4, la pérdida de la estructura celular y la tinción débil indican daño irreversible en las paredes bacterianas. Finalmente, a $\text{pH} \leq 3$, no se observan estructuras definidas, lo que demuestra la muerte celular. Estos hallazgos respaldan la existencia de un umbral crítico de tolerancia fisiológica a $\text{pH} \leq 4$, más allá del cual los mecanismos de adaptación colapsan. (14)

Este hallazgo tiene implicancias directas en la prevención de la caries dental. Sugiere que mantener el pH bucal por encima de 4 puede ser clave para prevenir la colonización y persistencia de *S. mutans*, ya que impide que alcance niveles de viabilidad suficientes para iniciar procesos patológicos. Aunque *S. mutans* es conocido por su aciduricidad, nuestros resultados demuestran que esta capacidad tiene límites funcionales que no pueden ser superados en condiciones de acidez extrema. (18)

Asimismo, la F1F0-ATPasa cumple un rol fundamental en la expulsión activa de protones, manteniendo la homeostasis interna. Este sistema ha sido identificado como uno de los principales determinantes de la aciduricidad de *S. mutans*, lo cual explica por qué puede sobrevivir en condiciones moderadamente ácidas, aunque no indefinidamente en acidez extrema. (19)

Otro aspecto clave observado fue la capacidad de la bacteria de generar biopelículas incluso bajo estrés ácido, aunque en menor densidad. La producción de glucanos insolubles mediada por las glucosiltransferasas (Gtfs) asegura la formación de una matriz protectora que facilita la persistencia del biofilm en condiciones adversas. (20)

Este comportamiento se alinea con lo planteado por Marsh (5) en el modelo de “placa ecológica”, en el cual la disminución del pH favorece la selección de especies acidogénicas y acidúricas. En este sentido, los resultados obtenidos refuerzan la idea de que *S. mutans* es una de las bacterias mejor adaptadas a los cambios de acidez en la cavidad oral. (21) Además, Senadheera & Cvitkovich (23) y Koo et al. (6) han demostrado que en modelos polimicrobianos, la acidez selectiva no solo favorece a *S. mutans*, sino que reduce la diversidad microbiana, creando un nicho disbiótico, lo que refuerza la relevancia clínica de modular el pH bucal.

La comparación con antecedentes nacionales es igualmente reveladora. Ramos (9) demostró que un pH salival más bajo se asocia con una mayor prevalencia de caries en escolares, lo cual refuerza la importancia del pH como modulador clínico. Nuestros resultados experimentales respaldan esta relación, evidenciando cómo la acidez favorece la selección de *S. mutans*.

De igual manera, Huamán (10) observó que el pH ácido incrementa la producción de exopolisacáridos en biofilms de *S. mutans* aislados de pacientes pediátricos. En nuestra

investigación, este fenómeno se corroboró mediante la observación microscópica de biopelículas más estructuradas a pH moderadamente ácido.

La relación entre pH y caries dental también ha sido resaltada por Kidd (12) y subraya que la acidogenicidad y aciduricidad son las propiedades centrales que explican la patogenicidad de *S. mutans*. En este estudio, ambas características quedaron demostradas experimentalmente.

En términos clínicos, los resultados resaltan la importancia de mantener el pH oral por encima de 5,5, considerado el umbral crítico para evitar la desmineralización. Estrategias como el uso de agentes alcalinizantes, la estimulación del flujo salival y la reducción del consumo de carbohidratos fermentables son esenciales para mantener el equilibrio oral. (3)

Asimismo, estos hallazgos tienen implicancias para el desarrollo de biomateriales dentales. El uso de cementos o resinas con liberación de iones de calcio o flúor puede contribuir a contrarrestar el descenso del pH en la biopelícula, reduciendo la viabilidad de *S. mutans* y previniendo la progresión de caries. (4)

La resistencia de *S. mutans* en ambientes ácidos también se asocia con la activación de sistemas de comunicación bacteriana como ComCDE, que regulan la expresión de factores de virulencia. Estos mecanismos refuerzan su capacidad de persistir en un entorno competitivo como la cavidad oral.

Otro aspecto relevante es la capacidad de la bacteria de inducir cambios en el microbiota circundante. Al generar un microambiente ácido, favorece la selección de especies igualmente acidúricas, consolidando un ecosistema disbiótico en el que se reduce la diversidad microbiana y se potencia el riesgo de caries. (22)

En el ámbito de la salud pública, los resultados cobran gran relevancia, ya que la caries dental continúa siendo una de las enfermedades de mayor prevalencia en el Perú. La comprensión de los mecanismos que permiten la supervivencia de *S. mutans* frente al pH ácido puede orientar nuevas estrategias preventivas y terapéuticas. (23)

Entre estas estrategias se incluyen la educación nutricional, el fomento de hábitos de higiene oral que reduzcan la acumulación de biopelículas, y la investigación en compuestos naturales o sintéticos con capacidad para modular el pH y desestabilizar la matriz de los biofilms. (8)

En síntesis, la presente investigación demuestra que el pH es un modulador esencial de la viabilidad y formación de biopelículas de *Streptococcus mutans*. Al integrar los hallazgos con los antecedentes internacionales y nacionales, se concluye que la acidogenicidad y aciduricidad son las principales características que explican su éxito como agente cariogénico. Además, se abre la posibilidad de orientar futuras investigaciones hacia la identificación de blancos moleculares específicos, como el operón *sat* o las glucosiltransferasas, para el diseño de nuevas terapias contra la caries dental.



CONCLUSIONES

La viabilidad de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) es altamente dependiente del pH del medio. Se observó un crecimiento óptimo a pH 7 ($OD_{600} = 0.85 \pm 0.05$), con disminución progresiva conforme el pH se acidificó: moderado a pH 6 ($OD_{600} = 0.42 \pm 0.10$), bajo a pH 5 ($OD_{600} = 0.15 \pm 0.10$), y prácticamente nulo a partir de pH 4 ($OD_{600} = 0.03 \pm 0.00$). No se detectó crecimiento bacteriano en condiciones extremas de acidez ($pH \leq 3$).

Existe un umbral crítico de tolerancia ácida en *S. mutans* alrededor de pH 4. A este valor, se evidenció colapso funcional irreversible, manifestado por la ausencia de turbidez, pérdida de integridad celular y presencia exclusiva de cocos aislados con tinción débil en la tinción de Gram. Esto indica que, más allá de su reconocida aciduricidad, la bacteria no puede mantener homeostasis intracelular ni viabilidad estructural por debajo de este límite.

Las alteraciones morfológicas observadas mediante microscopía óptica (100x) tras tinción de Gram constituyen un indicador confiable del estado fisiológico de *S. mutans*. A pH 7, las células presentaron cadenas largas y definidas (morfología normal); a pH 6, cadenas menos densas (inicio de estrés); a pH 5, cadenas cortas y dispersas (estrés severo); y a pH 4, cocos aislados con tinción débil (colapso celular). A $pH \leq 3$, no se identificaron estructuras bacterianas viables.

La combinación de mediciones cuantitativas (OD_{600}) y cualitativas (morfología celular) permitió una evaluación integral de la respuesta bacteriana al estrés ácido, confirmando que la pérdida de viabilidad no solo se refleja en la ausencia de crecimiento, sino también en cambios estructurales progresivos que preceden a la muerte celular.

Estos hallazgos respaldan que mantener el pH bucal por encima de 4 podría ser una estrategia efectiva para limitar la colonización y persistencia de *S. mutans*, incluso en individuos con alta exposición a carbohidratos fermentables. Esto refuerza la importancia del control del microambiente oral en la prevención de la caries dental.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de expresión proteómica en *Streptococcus mutans* expuesto a diferentes valores de pH, con el fin de identificar las proteínas involucradas en la tolerancia y adaptación al estrés ácido.

Desarrollar investigaciones transcriptómicas de *Streptococcus mutans* sometido a variaciones de pH, a fin de evaluar la activación de genes específicos, como el operón *sat* y aquellos asociados a la producción de exopolisacáridos, que regulan su capacidad de sobrevivir en condiciones de acidez.

Plantear el uso de agentes o materiales con propiedades neutralizantes que puedan interferir en la expresión de proteínas relacionadas con la aciduricidad y la virulencia de *S. mutans*, con el objetivo de proponerlos como blancos terapéuticos en la prevención de la caries dental.

Evaluar la respuesta de otras cepas de *S. mutans*. Dado que este estudio se realizó con una única cepa de referencia (ATCC 25175), se sugiere repetir el experimento con cepas clínicas aisladas de pacientes con alta prevalencia de caries, para determinar si existe variabilidad en la tolerancia fisiológica frente al estrés ácido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kassebaum N, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray C, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015; 94(5): p. 650-658.
2. Ministerio de Salud del Perú. Encuesta Nacional de Salud Bucal 2022. Ministerio de Salud.
3. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50(4): p. 353-380.
4. Banas J. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004;(9): p. 1267-1277.
5. Marsh P. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149(Pt2): p. 279-294.
6. Koo H, Xiao J, Klein M, Jeon J. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010; 192(12): p. 3024-3032.
7. Takada K, Hirasawa M, Ikeda T. Acid tolerance response of *Streptococcus mutans*: survival in acidic environments. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(6): p. 319-322.
8. Lemos J, Burne R. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2013; 159(11): p. 2437-2445.
9. Ramos J. Relación entre el pH salival y la prevalencia de caries en escolares de primaria. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
10. Huamán M. Capacidad de formación de biopelícula de *Streptococcus mutans* en condiciones de pH ácido en pacientes pediátricos. Cusco: Universidad Andina del Cusco.
11. Kidd E, Fejerskov O. Dental caries: the disease and its clinical management. Tercera ed. Wiley Blackwell: Oxford; 2016.
12. Flores P. Efecto de bebidas ácidas sobre la viabilidad de *Streptococcus mutans* in vitro [tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo.

13. Apaza A. Formación de biofilm de bacterias orales en medios con variaciones de pH [tesis]. Universidad Católica de Santa María, Arequipa.
14. Kremer BH, Kraan Mvd, Crowley PJ:HIR,BLJ:BAS. Characterization of the sat operon in streptococcus mutans: Evidence for role of Ffh in Acid Tolerance. *Journal of Bacteriology*. 2001; 183(8): p. 2543-2552.
15. Klein M, DeSanis T. The role of the sat operon in acid tolerance of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol. Journal of Bacteriology*. 2006; 188(1): p. 100-107.
16. Gao X, Zhang Q, Li Y. The role of the sat operon in acid tolerance of *Streptococcus mutans* under acidic conditions. *PLoS ONE*. 2012; 7(8): p. e42784.
17. Oyama S, Kawamura Y. Acid Tolerance mechanisms in oral streptococci. *Archives of Oral Biology*. 2009; 54(1): p. 1-7.
18. Brinkman JM, Van der Veen MH. Regulation of acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology*. 2010; 109(6): p. 1879-1886.
19. Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of *Streptococcus mutans* to environmental stresses. *Microbiology*. 2005; 151(9): p. 2915- 2923.
20. Wen ZT, Liao S, Burne RA. Effects of environmental pH on competence development by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 2001; 69: p. 6829-6835.
21. Senadheera D, Cvitkovich DG. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2008; 631: p. 178 - 188.
22. Quivey RG, Kuhnert WL, Hahn K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2000; 11(3): p. 303 - 314.
23. Biswas S, Biswas I. Role of the sat operon in acid tolerance and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Molecular Oral Microbiology*. 2013; 28(5): p. 352 - 363.

ANEXOS

1. ANEXOS FOTOGRÁFICOS

Título: Alteraciones morfológicas de *Streptococcus mutans* a diferentes valores de pH.

Metodología: Tinción de Gram, observación microscópica a 100x (inmersión).

Fuente: Laboratorio de Química de Proteínas – VRI, UCSM.

1.1. Viabilidad de *S. mutans* en pH 7

En condiciones de neutralidad se observa un crecimiento óptimo de *S. mutans*, evidenciado por alta turbidez turbidez en el medio de cultivo, se identificaron cocos Gram positivos dispuestos en cadenas largas y definidas, indicativos de una morfología celular normal y una integridad estructural preservada.

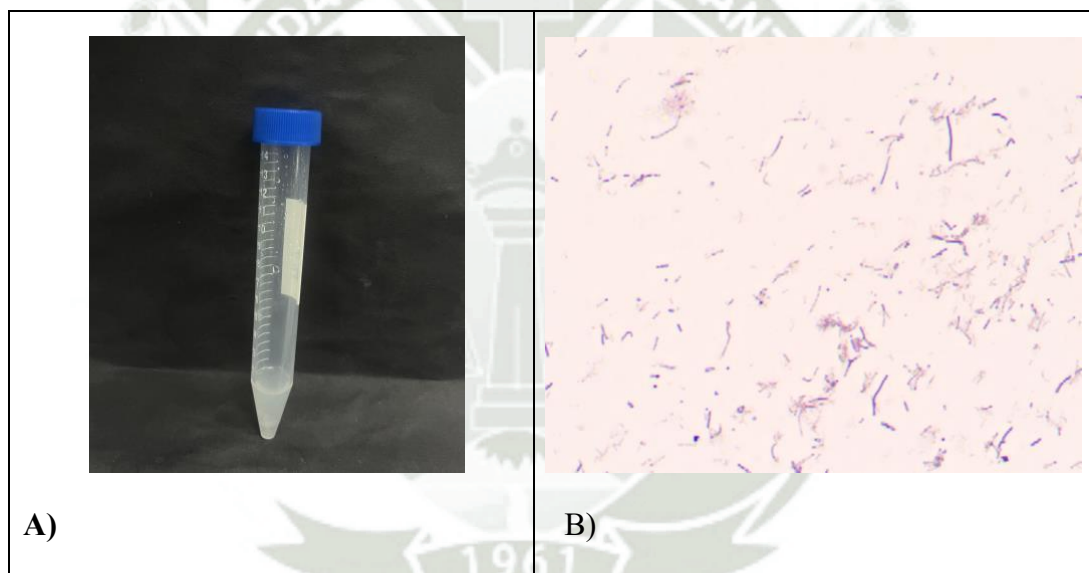


Figura 1

El tubo Falcon muestra una turbidez intensa, indicando crecimiento óptimo.

*Microscópicamente, a un aumento de 100x, se observan cocos Gram positivos dispuestos en cadenas largas y definidas, compatibles con *S. mutans*. **Figura A:** Se aprecia turbidez intensa en el medio. **Figura B:** Se observa microscópicamente crecimiento abundante de *S. mutans* en cadenas definidas.*

1.2. Viabilidad de *S. mutans* en pH 6

En el pH 6 la viabilidad bacteriana se mantiene de forma moderada, observándose turbidez ligera, cocos Gram positivos en cadenas menos densas y una reducción en la cantidad de células respecto al pH 7, lo que sugiere el inicio de un estrés celular adaptativo.

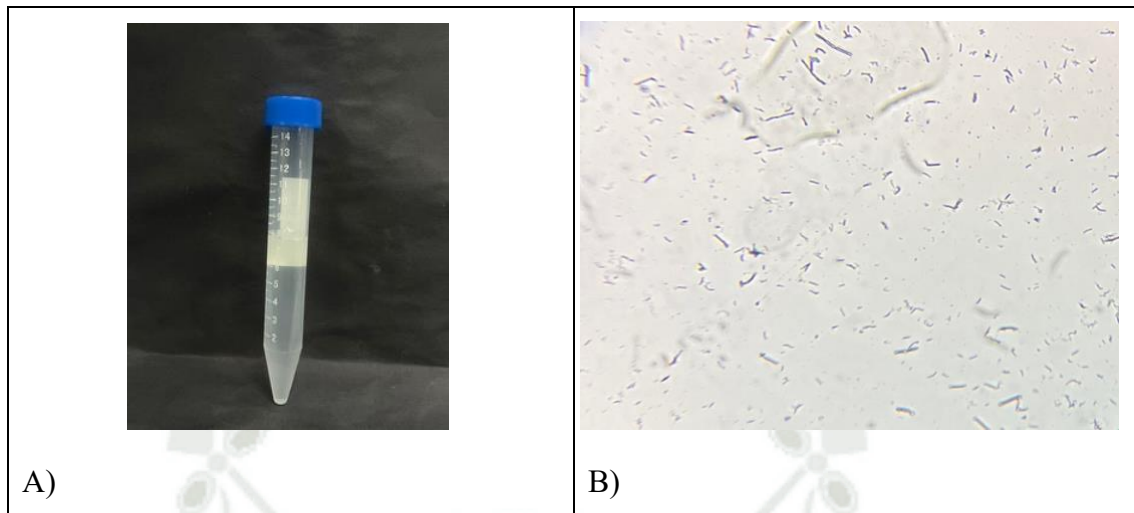


Figura 2

El tubo Falcon evidencia una turbidez ligera, lo que corresponde a un crecimiento moderado. En la observación microscópica (100x), se aprecian cocos Gram positivos en cadenas poco densas, con disminución en la cantidad de bacterias respecto al pH 7

Figura A: *Turbidez ligera en el medio. Figura B:* *Se observa microscópicamente crecimiento moderado de *S. mutans*.*

1.3. Viabilidad de *S. mutans* en pH 5

A este pH el crecimiento se inhibe parcialmente: no se detectó turbidez visible, la tinción de Gram revela pocas bacterias con morfología alterada, dispuestas en cadenas cortas y dispersas, lo que indica una pérdida progresiva de la capacidad de agrupamiento y una alteración en la integridad celular.

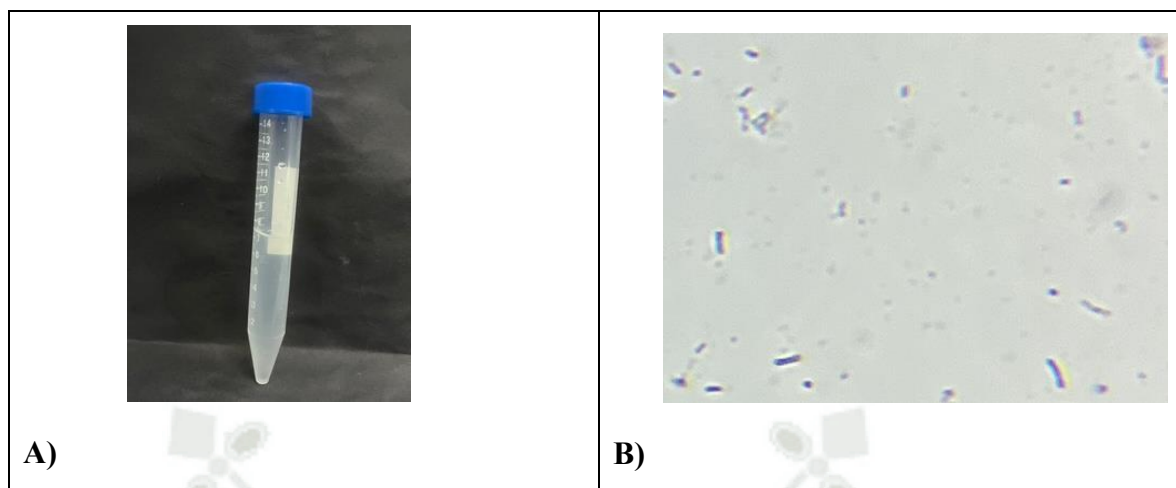


Figura 3

*El tubo Falcon no muestra turbidez visible, sugiriendo inhibición parcial del crecimiento. Al microscopio (100x), se observan escasos cocos Gram positivos con morfología alterada y en cadenas cortas dispersas. **Figura A:** ausencia de turbidez.*

***Figura B:** se observan escasos cocos Gram positivos en cadenas cortas y dispersas.*

1.4. Viabilidad de *S. mutans* en pH 4

El descenso del pH provoca una pérdida crítica de viabilidad, turbidez ausente. Solo se distinguieron escasos cocos aislados de tinción débil al microscopio lo que indica una severa pérdida de integridad celular y el colapso de los mecanismos de adaptación.

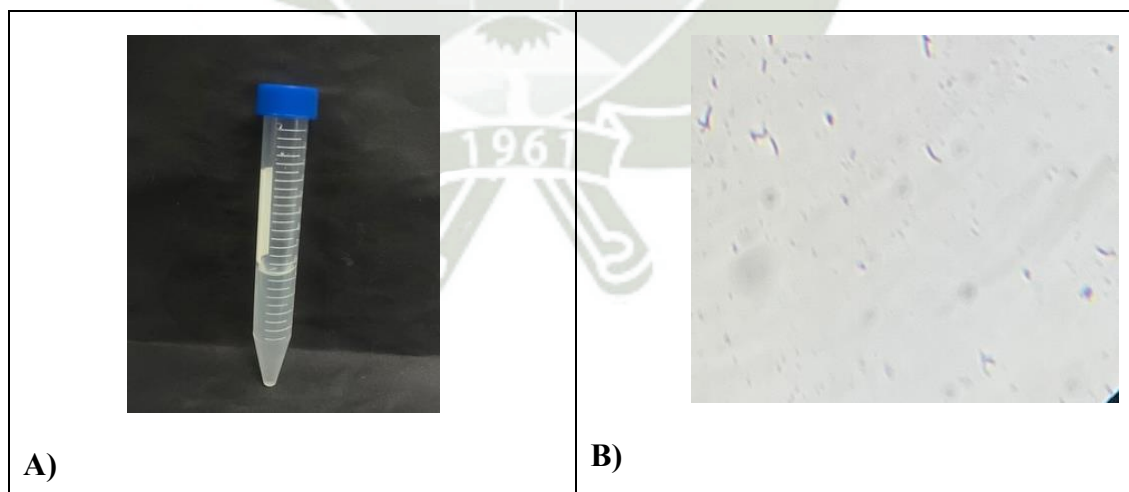


Figura 4

El tubo Falcon se observa sin turbidez, confirmando ausencia de crecimiento.

*Microscópicamente (100x), se distinguen únicamente algunos cocos aislados con tinción débil, lo que indica pérdida de integridad celular. **Figura A:** medio claro, sin turbidez.*

***Figura B:** se observan microscópicamente bacterias aisladas con tinción débil.*

1.5. Viabilidad de *S. mutans* en pH 3

En condiciones de pH 3 se evidencia falta de crecimiento bacteriano; el medio permanece claro y la tinción de Gram no muestra bacterias viables, únicamente restos celulares. Lo que indica la inhibición total de la viabilidad.

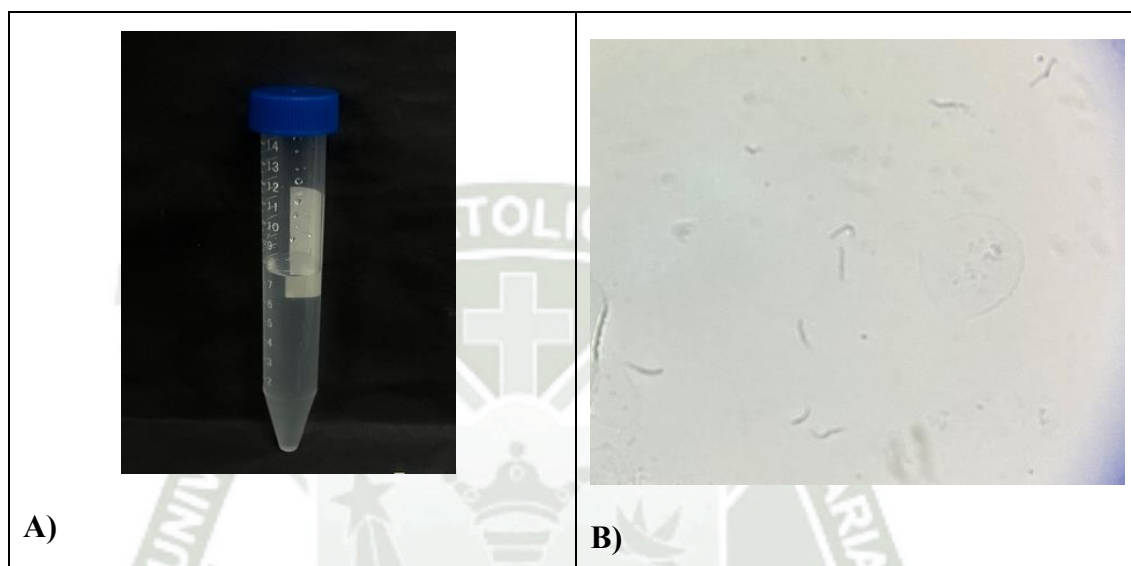


Figura 5

*El tubo Falcon muestra un medio totalmente claro, sin señales de turbidez. En la observación microscópica (100x), no se aprecian bacterias viables, observándose únicamente restos celulares. **Figura A:** Medio sin turbidez. **Figura B:** No se observan bacterias viables al microscopio.*

1.6. Viabilidad de *S. mutans* en pH 2

En este ambiente en condiciones de pH 2 no hay signos de viabilidad bacteriana; el medio es transparente y no se evidencian estructuras bacterianas definidas al microscopio.

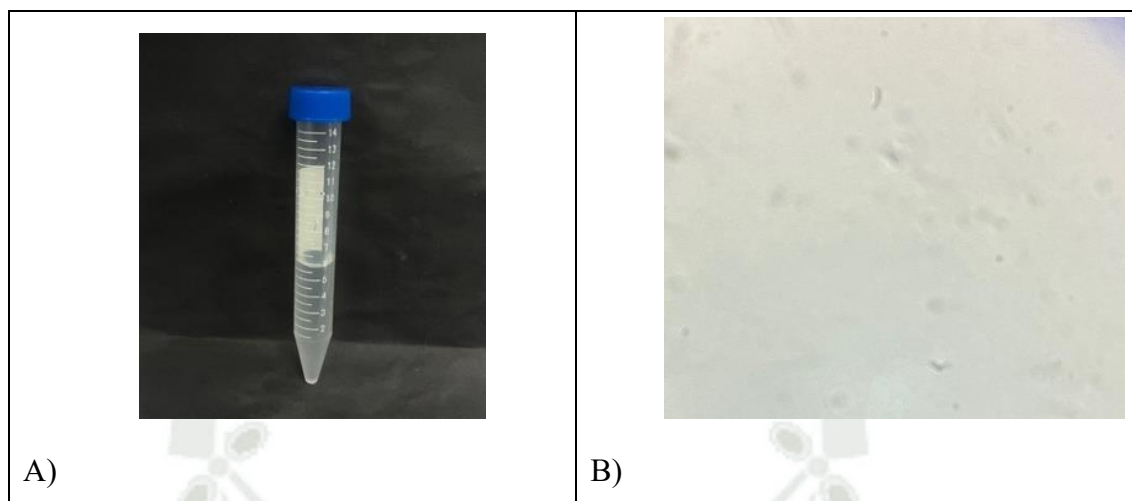


Figura 6

*El tubo Falcon se mantiene transparente, evidenciando la inhibición total del crecimiento. Microscópicamente (100x), no se observan estructuras definidas de *S. mutans*. **Figura A:** Medio completamente claro. **Figura B:** No se observan estructuras definidas al microscopio.*

1.7. Viabilidad de *S. mutans* en pH 1

El pH extremo resulta incompatible con la vida bacteriana, con medio totalmente transparente y sin presencia de bacterias viables al microscopio.

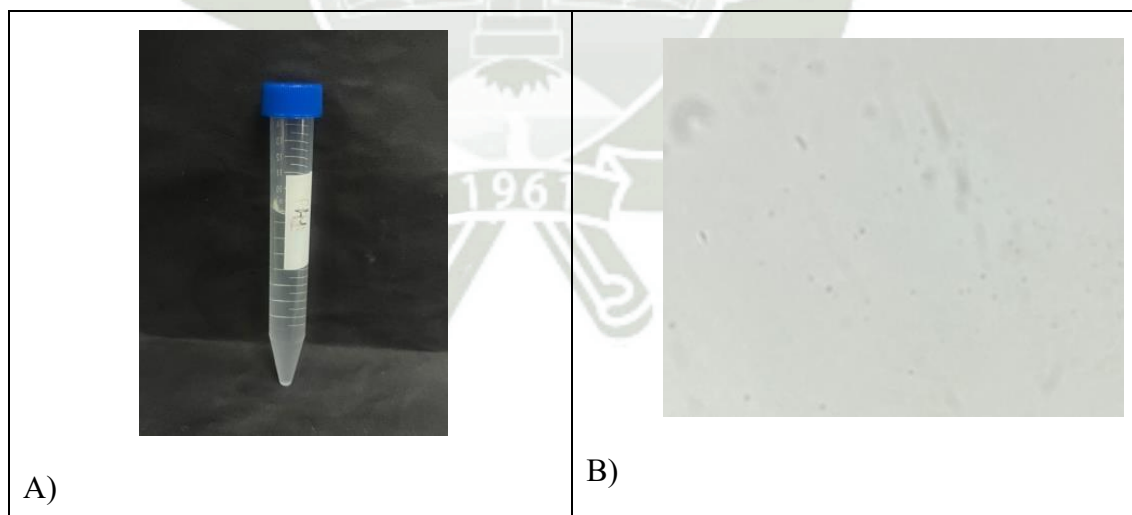


Figura 7

*El tubo Falcon muestra un medio completamente claro, sin indicios de crecimiento. Al microscopio (100x), no se visualizan bacterias viables ni estructuras celulares reconocibles. **Figura A:** medio sin turbidez. **Figura B:** no se observan bacterias viables en la tinción de Gram.*