

Variación de la microbiota oral por factores ambientales

Trabajo de Fin de Grado por Juan Encina Santiso,
dirigido por Dr. José Enrique Torres Vaamonde

**Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Celular y Molecular.
Área de Microbiología. A Coruña, 2015-2016.**



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
TRABAJO EXPERIMENTAL.....	5
Objetivo:	5
Material:	5
Metodología:	5
Preparación	6
Procesamiento.....	7
Toma de datos.....	7
DISCUSIÓN Y RESULTADOS	8
CONCLUSIONES	10
AGRADECIMIENTOS.....	10
ANEXO: TABLAS	11
FUENTES Y REFERENCIAS	19

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado cómo influye fumar, beber alcohol, cepillarse los dientes, morderse las uñas y llevar ortodoncia en las comunidades microbianas de la boca. Para ello, se tomaron veintidós muestras de la boca de sus correspondientes voluntarias y se realizaron con ellas varias diluciones seriadas que fueron sembradas por triplicado en tres medios sólidos diferentes en placas de Petri: tripticasa de soja, VRBG y Mueller-Hinton con sangre de cordero al 5%. Mediante el cultivo en aerobiosis a 37°C durante 24-72 h se obtuvo información de la carga total de bacterias mesófilas aerobias, de bacterias hemolíticas y de bacterias fecales presentes en la cavidad oral. Como resultado del recuento de colonias se ha obtenido que llevar ortodoncia incrementa sustancialmente la carga microbiana total de la boca y de las bacterias α -hemolíticas en particular. También se ha comprobado que morderse las uñas está directamente relacionado con el aislamiento de bacterias fecales en la cavidad oral, que son eliminadas por el consumo de drogas legales (alcohol y tabaco). No se ha detectado efectos en cuanto a los niveles de cepillado.

RESUMO

Neste traballo estudouse cómo inflúe fumar, beber alcohol, cepillarse os dentes, morderse as unllas e levar ortodoncia nas comunidades microbianas da boca. Para iso, tomáronse vinte e dúas mostras da boca das súas correspondentes voluntarias e realizáronse con elas varias dilucións seriadas que foron sementadas por triplicado en tres medios sólidos diferentes en placas de Petri: tripticasa de soia, VRBG e Mueller-Hinton con sangue de aña ao 5%. Mediante o cultivo en aerobiose a 37°C durante 24-72 h obtívose información da carga total de bacterias mesófilas aerobias, de bacterias hemolíticas e de bacterias fecais presentes na cavidade oral. Como resultado do reconto de colonias obtívose que levar ortodoncia incrementa substancialmente a carga microbiana total da boca e das bacterias α -hemolíticas en particular. Tamén comprobouse que morderse as unllas está directamente relacionado co illamento de bacterias fecais na cavidade oral, que son eliminadas polo consumo de drogas legais (alcohol e tabaco). Non detectouse efectos en canto aos niveis de cepillado.

ABSTRACT

In this work, how smoking, drink alcohol, teeth washing, nails biting and carry orthodontics affects to microbial communities of the mouth was studied. To make that, twenty-two samples from the mouth of their respective volunteers were taken and with them some seriated dilutions were made. This dilutions were sown by triplicate in three solid media in Petri dishes: tripticase-soy, VRBG and Mueller-Hinton with lamb blood at 5%. The aerobic culture at 37°C during 24-72 h brang us information about the total mesophilic aerobic bacteria charge, haemolytic bacteria and fecal bacteria present into oral cavity. As a result of the recount of colonies, it seems that carry orthodontics increases substantially the total microbial charge and α -haemolityc bacteria in particular. In addition, nails biting is directly linked to the isolation of fecal bacteria into oral cavity, which are eliminated by alcohol and tobacco consumption. Effects between the teeth washing levels have not been detected.

Palabras clave: bacterias, boca, tabaco, alcohol, cepillado, ortodoncia, uñas, variación

INTRODUCCIÓN

La Microbiología Oral ha suscitado interés desde hace décadas, quizás ya desde que se vieron bacterias por primera vez, cuando en el siglo XVII Leeuwenhoek, observando con su rudimentario microscopio el sarro descubrió que hay más organismos habitando en la superficie de los dientes de una persona que animales en la selva tropical. Tal es el impacto de esta disciplina que se pueden encontrar libros enteros dedicados solamente a ella (Liébana Ureña, 2002), y cada vez más trabajos de investigación que la hacen uno de los principales frentes de avance en Microbiología, aunando la visión clínica con la ecológica y ambiental, clásicamente separadas.

Si bien el cuerpo humano está compuesto por unos cincuenta mil millones de células propias, se estima que una persona posee hasta diez veces más de células microbianas habitando en ella, alimentándose y creciendo a expensas de los nutrientes y desechos que nuestro organismo les proporciona. A su vez, estas bacterias indígenas funcionan para el individuo como una de sus principales barreras defensivas, compitiendo con potenciales patógenos por el espacio y los recursos o produciendo sustancias microbicidas, dificultando, junto con el resto de defensas inmunitarias, que los patógenos prosperen y/o generen enfermedad (Wenner, 2007; Madigan et al., 2003).

En particular, hay acuerdo unánime en que, de todas las zonas del cuerpo, la boca contiene una microbiota especialmente complicada, lo que se debe a los numerosos soportes susceptibles de colonización diferentes que ofrece: superficies minerales duras como los dientes, cavidades como los pliegues gingivales, zonas expuestas como el epitelio de las mejillas o las meras rugosidades de la lengua, entre otros. Además, a esto se suma que una persona cualquiera se encuentra expuesta a multitud de microorganismos a través de los alimentos, del aire aspirado, del agua o por el contacto con superficies u otros individuos. Aun así, que estos microorganismos prosperen o qué comportamientos y actividades presenten depende de las condiciones ambientales en que se desarrollen (Reddy et al., 2013; Liébana Ureña, 2002).

En los últimos años han aumentado notablemente, potenciadas por la aparición de técnicas de análisis molecular, las investigaciones centradas en determinar qué factores ambientales afectan a la microbiota oral indígena y en qué manera la perturban y moldean. Entre dichos factores, destacan en la literatura científica los parámetros físicos como la **temperatura**, el **pH** o la **acción lavadora** de la **saliva**, a los cuales la microbiota residente debe estar ciertamente adaptada para permanecer en la boca (Liébana Ureña, 2002; Madigan et al., 2003).

La mayor parte de bacterias que habitan en nuestra cavidad oral son **mesófilas**, con crecimientos óptimos en torno a los **37°C** del cuerpo humano, pero capaces de resistir cambios bruscos de temperatura, así como las variaciones de la acidez, derivadas de la ingesta de bebidas y alimentos. Algunas no son sólo resistentes a las acideces elevadas sino que contribuyen a la **acidificación del medio** mediante su metabolismo. Este es el caso de los **estreptococos**, Gram positivas del grupo de las **bacterias lácticas**, que consumen azúcares (especialmente, la **sacarosa**) y liberan ácido láctico como principal o único producto de excreción (Liébana Ureña, 2002).

Cuando las poblaciones bacterianas productoras de ácido crecen demasiado, la acusada disminución del pH da como resultado un desequilibrio a nivel de los balances de desmineralización y remineralización de la capa de esmalte dental. De esta manera, dicha capa se horada poco a poco hasta llegar a las partes orgánicas del diente, que sufren necrosis, dando lugar al cuadro clínico característico de la **caries** (Madigan et al., 2003; Liébana Ureña, 2002).

Como los desequilibrios en la actividad y densidad de los diferentes grupos bacterianos presentes en la boca se deben al ambiente donde crecen y pueden dar lugar a la aparición de enfermedades orales y sistémicas (Reddy et al., 2013), comprender el efecto de variación de la microbiota oral por factores ambientales se vuelve algo muy importante para prevenir o controlar algunas infecciones y evitar o potenciar según qué comportamientos.

Por otro lado, otro fenómeno que contribuye a la patogenicidad de los estreptococos¹ y a la prosperidad de las bacterias en general en ambientes donde son susceptibles de ser arrastradas es la **adhesión selectiva a superficies**, de gran importancia en la boca debido a la acción lavadora de la saliva y la descamación continua de los epitelios. Esta característica se manifiesta en la formación de **biopelículas**², poblaciones de bacterias embebidas en una matriz de mucopolisacáridos que facilitan su adhesión al tiempo que las protegen de agentes antimicrobianos, crean más ambientes y condiciones ecológicas y facilitan intercambios genéticos por conjugación (Madigan et al., 2003; Kolenbänder et al., 2002). Concretamente, la biopelícula formada sobre los dientes es conocida como **placa dental** y su reducción mediante el **cepillado rutinario** es determinante en cuestión de higiene debido a la rapidez con la que se forma, motivada por la disponibilidad excesiva de azúcares (Madigan et al., 2003). De esta manera, el consumo de azúcar por parte de una persona incentiva simultáneamente en su boca la acidificación por metabolismo bacteriano y el crecimiento de las comunidades microbianas en forma de placa dental.

Sin embargo, ni temperatura, ni acidez, ni acción lavadora de la saliva son, ni mucho menos, los únicos factores que pueden influir en la microbiota residente de la boca. Precisamente, en este trabajo se ha enfocado a otros factores que dependen más del hábito humano como el **consumo de drogas legales** (tabaco y alcohol), la posesión de **ortodoncia** o el acto de **morderse las uñas**.

En marzo de este mismo año ha sido publicado, en la revista de la Sociedad Internacional de Ecología Microbiana (ISME), un trabajo en el que sus autores, basándose en técnicas de metagenómica, exploraron el microbioma oral de fumadores y no fumadores en busca de diferencias. Entre sus resultados, obtuvieron que el tabaquismo dificulta el crecimiento de muchas especies de proteobacterias, el gran filo de microorganismos Gram negativas, entre los que se encuentran algunos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos como los que hay en el humo del tabaco. Al mismo tiempo, hallaron que algunas especies de estreptococos veían sus poblaciones aumentadas en las bocas de los fumadores con respecto a la de los no fumadores. Con esto, los autores sugieren que el hecho de fumar podría incrementar del riesgo de padecer enfermedades orales. Entre las explicaciones que han dado a este fenómeno se incluye la presencia de algunas sustancias con actividad antibiótica en el tabaco, la reducción de la disponibilidad de oxígeno en la boca y la acidificación de la saliva asociada al humo (Wu et al., 2016; Taub, 2016).

¹ Además de la caries, los estreptococos son iniciadores de otras infecciones importantes con repercusiones tales como fiebre reumática, faringitis, endocarditis o escarlatina (García, 2012). Son bacterias con exigencias nutricionales complejas y su cultivo en laboratorio se suele realizar en **medios enriquecidos con sangre defibrinada o suero**. En los primeros, de hecho, se manifiesta una propiedad de **hemólisis** o degradación de la sangre derivada de la **producción de toxinas estreptocócicas** (β -hemolíticos) o **agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno** (α -hemolíticos). Esto se aplica como carácter diagnóstico diferencial de diferentes grupos de estreptococos (Liébana Ureña, 2002).

² La formación de la biopelícula se debe a la activación de ciertos genes en respuesta no sólo de la densidad de población, sino también al grado de actividad del agua y a la disponibilidad de nutrientes. En los cultivos de agar en el laboratorio, donde las células tienen todos los nutrientes que necesitan en exceso, crecen formando **colonias**, que no son equivalentes a biopelículas ni a nivel estructural ni a nivel de expresión génica (Mikkelsen et al., 2007).

Un trabajo anterior y también reciente estudió la formación de la placa dental gingival y subgingival de fumadores y no fumadores mediante un análisis similar basado en los genes para ARNr 16S, encontrando que las biopelículas que se desarrollaban sobre los dientes de los fumadores de su muestra tendían a ser colonizadas de forma temprana por patógenos periodontales y respiratorios ([Kumar et al., 2011](#)).

Otra investigación de los últimos años basada en metagenómica y que combinaba los factores de tabaquismo y dación al alcohol prolongados en el tiempo concluía que la riqueza específica en la composición de la placa dental disminuía con este consumo, formándose unas biopelículas más homogéneas a nivel de variabilidad entre grupos, con las consecuencias para la salud que eso pudiera acarrear. La mayor parte de especies más dramáticamente afectadas resultaron ser Gram negativas microaerófilas o anaerobias. Cabe señalar que algunos de estos microorganismos no basan su metabolismo en el consumo de azúcares, sino en el de ácidos orgánicos, por lo que su presencia podría tener un papel mitigador del proceso cariogénico y su ausencia o disminución, en consecuencia, podría convertirse en un factor de riesgo de sufrir con mayor facilidad caries dental ([Maltez Thomas et al., 2014](#)).

Asimismo, no es raro encontrar en la cavidad oral bacterias que, en principio, no deberían estar ahí, como son algunas especies de la familia de las **enterobacterias**, Gram negativas habitantes normales del intestino de los animales ([Goldberg et al., 1997](#)). Lo más habitual es que estos microorganismos lleguen hasta la cavidad oral por medio de las manos³, con las que tenemos contacto con muchos objetos y superficies pero nos olvidamos de lavar con frecuencia. Así, algo tan común en algunas personas como morderse las uñas puede ser vehículo de bacterias intestinales y patógenos asociados⁴ ([Reddy et al., 2013](#)). Sus cuantías, parece ser, también son anormalmente altas en los individuos con dentadura postiza ([Goldberg et al., 1997](#)); en este trabajo atenderemos en su lugar al efecto del aparato dental u ortodoncia.

Salta a la vista, pues, que en los últimos años ha aflorado un interés por ir más allá de los factores meramente físicos y averiguar de qué manera algunos comportamientos como el consumo de drogas o condiciones como el portar prótesis dentales afectan a la microbiota de nuestra boca, en tanto que sólo en tiempos recientes ha empezado a comprenderse su importancia en nuestra salud y en nuestra enfermedad, no solamente oral, sino también a nivel respiratorio o incluso cardiovascular. Es este mismo interés el que ha impulsado del desarrollo de este trabajo.

³ Los alimentos y las aguas tratados de forma inadecuada durante su procesamiento o depuración, así como algunas prácticas sexuales o el papel de vector de las moscas o los animales domésticos son otros motivos por los que es frecuente que aparezcan bacterias fecales en la cavidad oral ([Conant, 2005](#)).

⁴ Dentro de la familia de las enterobacterias destacan los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterbacter*, *Proteus* o *Providencia*, a los que pertenecen algunas especies o cepas capaces de producir enfermedades como meningitis, disentería bacilar o intoxicación alimentaria ([Reddy et al., 2013](#)). Asimismo, la presencia de enterobacterias en la boca, aun comportándose éstas de forma inocua, puede indicar que el individuo ha estado en contacto con otros microorganismos realmente patógenos que pueden aparecer en la materia fecal, revelándose así como un factor de riesgo en la transmisión de algunas enfermedades infecciosas (giardiasis, criptosporidiosis, hepatitis A, hepatitis B, poliomielitis, cólera, fiebre tifoidea, shigellosis...) ([Conant, 2005](#)). Por otro lado, las enterobacterias también se encuentran asociadas al mal aliento, derivado del metabolismo bacteriano a través de la producción de mercaptanos, ácido sulfhídrico y aminas como la cadaverina que se forman a partir de la descomposición de los restos de alimentos (en particular, las proteínas) que quedan en la boca tras las comidas y no se retiran ([Goldberg et al., 1997](#)).

TRABAJO EXPERIMENTAL

Objetivo:

Este trabajo se centra en encontrar diferencias significativas atribuibles a variaciones ambientales en la composición de las comunidades microbianas de la boca de diferentes personas en términos de grupos generales de bacterias: **mesófilos aerobios no exigentes, hemolíticos y enterobacterias**. Entre todos los factores ambientales posibles, se ha prestado atención al **tabaquismo**, la **ingesta de alcohol**, el **cepillado**, el **llevar ortodoncia** y el **acto de morderse las uñas**, variables que, por su impacto directo en la boca, podrían tener también influencia en su microbiota. Con ello se pretende poner de manifiesto cómo un sólo individuo funciona al mismo tiempo como un ecosistema y cómo las poblaciones que habitan en él se ven influenciadas por sus propios actos, con las repercusiones en la salud y la higiene que de ellas se deriven.

Material:

- Medios de cultivo: TSA, VRBG, MH Sangre 0,5%
- Placas Petri
- Pipetas semiautomáticas y puntas desechables
- Estufa
- Autoclave
- Matraces Erlenmeyer de vidrio
- Agua destilada
- Contador de colonias automático
- Asas de siembra de Digrafsky
- Mechero Bunsen
- Probetas y vasos de precipitados
- Tubos de vidrio y gradilla
- Tampón salino estéril 0,7%
- Mosca y agitador magnético
- Baño termostático
- Programas Excel 2010 y R

Metodología:

Se ha optado por realizar un recuento de viables por cultivo microbiológico tradicional en medio sólido en aerobiosis por siembra en superficie y por triplicado en tres tipos de medios: un medio general tripticasa de soja; un medio selectivo y diferencial para Gram negativas pertenecientes al grupo de las enterobacterias y un medio enriquecido con sangre, diferencial para hemolíticos.

El experimento se ha llevado a cabo en tres fases: una **fase de preparación** (en la que se seleccionan los individuos a muestrear y se preparan los medios de cultivo que se van a usar), una **fase de procesamiento** (en la que se toma la muestra, se siembra y se incuba) y una **fase de toma de datos** (en la que se cuantifican las colonias bacterianas crecidas en el medio correspondiente).

La muestra sobre la que se ha realizado el estudio está compuesta por veintidós chicas de entre 19 y 29 años, sin pareja o que llevan más de un mes sin mantener contactos íntimos, de dieta omnívora y que no están medicándose con antibióticos ni superando ningún tipo de enfermedad (ninguna con diabetes, gripes, catarros, dolencias gastrointestinales, etc.); todas desarrollan su vida en la ciudad de Coruña, todas declararon un consumo de azúcar más o menos similar y la toma de la muestra se realizó al menos dos horas después del último cepillado. A estas voluntarias se les entregó un **cuestionario** donde respondieron una serie de cuestiones relativas a sus hábitos de consumo y actividad. La muestra se obtuvo mediante enjuague bucal con un tampón salino esterilizado en autoclave. A partir de estos enjuagues se han realizado diluciones seriadas, las cuales se usaron para realizar las siembras en los diferentes medios de cultivo.

La realización del experimento se ha llevado siempre en **condiciones de asepsia**, trabajando a la llama de un **mechero Bunsen** y con **material esterilizado** para garantizar que los únicos microorganismos que aparecieron durante el proceso procedieron únicamente de las muestras.

Preparación

En este estudio, se han utilizado los siguientes medios:

- **Agar Tripticasa-Soja (TSA):** El agar TSA es un medio general que permite el crecimiento de microorganismos no demasiado exigentes desde el punto de vista nutricional. La fórmula del medio es:

Peptona de caseína.....	5,0 g/L
Extracto de levadura.....	2,5 g/L
Dextrosa.....	1,0 g/L
Agar.....	9,0 g/L

pH final de $7,0 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

- **Agar Violeta-Rojo-Bilis-Glucosa (VRBG):** El agar VRBG es un medio selectivo y diferencial para enterobacterias. En este medio, los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias lo aportan la peptona y el extracto de levadura. Se aporta glucosa como carbohidrato. Las sales biliares son selectivas para bacterias intestinales que son resistentes a ellas, el cristal violeta inhibe el desarrollo de bacterias Gram positivas y el rojo neutro es un indicador de pH. Como todas las enterobacterias fermentan la glucosa con producción de diversos ácidos, el pH del medio de cultivo disminuye y las colonias de enterobacterias se observan rojas purpúreas, rodeadas generalmente de un halo sonrosado de bilis precipitada. La fórmula del medio es:

Peptona de caseína.....	7,000 g/L	Cloruro sódico.....	5,000 g/L
Extracto de levadura.....	3,000 g/L	Rojo neutro.....	0,030 g/L
Sales biliares.....	1,500 g/L	Cristal violeta.....	0,002 g/L
D(+)-glucosa.....	1,000 g/L	Agar.....	13,000 g/L

pH final de $7,4 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

- **Agar Mueller-Hinton 5% sangre de cordero:** En general, los medios de agar sangre se utilizan, por un lado, para hacer crecer bacterias más exigentes y, al mismo tiempo, para distinguir los microorganismos hemolíticos de los que no lo son.

Extracto de carne bovina.....	2,0 g/L	Almidón.....	1,5 g/L
Hidrolizado ácido de caseína.....	17,5 g/L	Agar.....	17,0 g/L
Sangre de carnero desfibrinada.....	5%		

pH final de $7,3 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

El medio de Mueller-Hinton sangre 5% no ha sido elaborado en el desarrollo de este trabajo: las placas han sido amablemente donadas por el Laboratorio de Microbiología del CHUAC y por D. Emelino Robles Puente, profesor de Microbiología en el C.I.F.P Ánxel Casal de A Coruña.

Los medios restantes se elaboraron en el laboratorio en **matraces Erlenmeyer de vidrio**. El agar tripticasa-soja fue esterilizado en el autoclave, mientras que el agar VRBG fue llevado a ebullición en un **agitador magnético termostatzado con mosca** para prevenir la precipitación de las sales biliares por sobrecalentamiento. Inmediatamente después de su esterilización, los medios aún líquidos se llevaron a atemperar al **baño termostático** a 50°C unos 10-15 min y, a continuación, se distribuyeron en placas de Petri para dejar que solidificaran a temperatura ambiente.

Procesamiento

Para la toma de la muestra se ha optado por hacer que cada voluntaria se enjuague con 10 mL de **solución salina (0,7%)** durante un minuto asegurándose de pasarla por toda la boca, sin centrarse en ningún punto en particular. El enjuague se colecta en un **vaso de precipitado estéril** y se procesa inmediatamente.

La muestra obtenida se procesó mediante la realización de diluciones seriadas. Para ello se diluyó en una proporción 1:9 con buffer salino 0,7% estéril, obteniendo una dilución 10^{-1} de la muestra. Se repitió el proceso dos veces para obtener una dilución 10^{-3} (**Figura 1**). Hecho esto, se sembraron en superficie y por duplicado 100 μ L de cada dilución en una **placa de agar** con un **asa de Digrafsky**. Las placas sembradas se rotulan con el código de la voluntaria, la fecha de inoculación y la naturaleza de la muestra y se incuban a 37°C entre 24-72 h. Después de la incubación se escogen aquellas placas que dan un conteo entre 30-300 ufc.

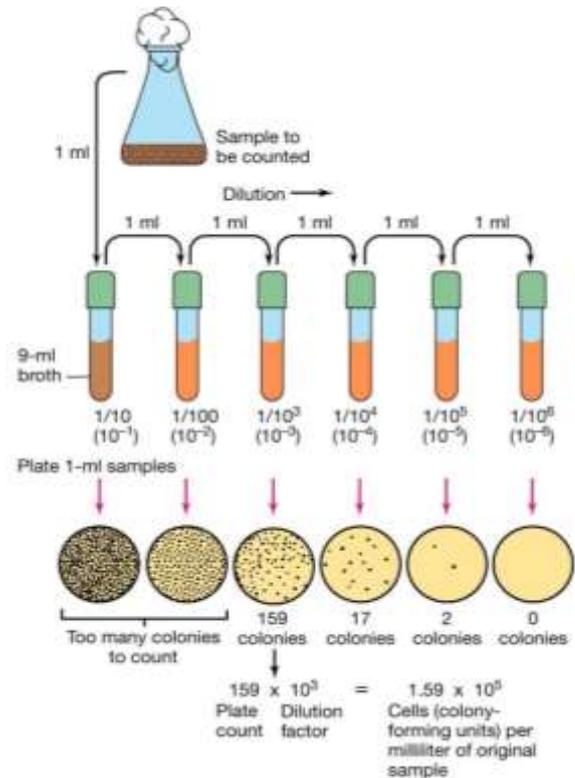


Figura 1. Procedimiento para la determinación de viables usando diluciones seriadas de la muestra y el método de siembra en placa (Fuente: Madigan et al., 2003).

Toma de datos

Tras la incubación, se ha procedido al recuento de colonias con ayuda de un **contador de colonias automático**.

- En el medio TSA se han contado todas las colonias que han crecido en él.
- En el medio VRBG se han contado exclusivamente las colonias de color morado con un halo sonrosado, indicativo de que las bacterias que la conforman pertenecen a la familia de las enterobacterias.
- El medio de agar sangre ha aportado información relevante de la proporción de diferentes grupos de estreptococos, considerados en función de sus propiedades hemolíticas. Las especies **β -hemolíticas** se observan rodeadas de un halo transparente como consecuencia de la destrucción de los glóbulos rojos por la producción de estreptolisinas. Las especies **α -hemolíticas**, en cambio, producen peróxido de hidrógeno, que oxida la hemoglobina de los eritrocitos a metahemoglobina, de manera que alrededor de estas colonias se puede ver un cambio de color de rojo a gris-verdoso o acastañado.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

El conjunto de datos generado comprende cinco variables numéricas relativas a las cuantías de microorganismos por volumen encontrados en la solución salina de enjuague, y seis variables categóricas relativas a los hábitos de las voluntarias. El objetivo del análisis es relacionar los datos de las primeras variables con los de las segundas, para lo cual se ha tratado de manera independiente cada grupo de microorganismos. Dentro de las variables numéricas, algunas como la cantidad de α -hemolíticos se comportan como variables continuas, mientras que otras, como la cantidad de Gram negativas fecales, son variables mixtas: presencia o ausencia y, en caso de presencia, diferentes niveles. En consecuencia, ambos tipos de variables se han tratado de forma distinta.

Las variables cuantitativas continuas de mesófilos, α -hemolíticos y no hemolíticos se han transformado de manera logarítmica para trabajar con datos más cómodos (una práctica habitual cuando manipulamos números de órdenes muy grandes como sucede en Microbiología), de forma que obtenemos una serie de variables nuevas con la forma $y_i = \log_{10}(x_i+1)$, donde x_i es el valor i de la variable x que cuantifica ufc/mL e y_i , su valor correspondiente en una escala logarítmica en base diez; el número uno que se le suma al valor original tiene el objetivo de evitar los casos en los que $x_i = 0$, en los cuales y_i no podría tomar ningún valor.

Ni en las variables originales ni en las transformadas nuestros datos se ajustan a una distribución normal según la **prueba de normalidad de Shaphiro-Wilk**, lo cual nos impide trabajar con pruebas del tipo t de Student y nos limita a **test no paramétricos** como las pruebas **de sumas de rangos de Wilcoxon** y **de Krustal-Wallis**⁵.

Con este tipo de análisis y a un nivel de confianza del 95%, llegamos a la conclusión de que llevar aparato dental incrementa de forma significativa y muy drástica la cantidad de microorganismos mesófilos aerobios no exigentes (**Tablas 1 y 12**). Es importante tener en cuenta que dentro de esta categoría pueden estar incluidos también hemolíticos y bacterias fecales, por lo que debe interpretarse como una **medida de la carga microbiana cultivable total** que hay en la boca. De hecho, **la variable mesófilos se encuentra correlacionada de forma significativa con la de bacterias fecales y α -hemolíticos** (**Tabla 14**). Podemos afirmar, pues, que **el uso de ortodoncia incrementa el número de microorganismos presentes en la cavidad oral**. Esto puede deberse, por un lado, a que los *brackets* y los alambres de ligadura aumentan la superficie a la que se pueden adherir las bacterias. Por otro lado, estos mismos elementos podrían entorpecer la retirada de las bacterias mediante el cepillado, contribuyendo en doble modo a la formación de la placa.

Se hace evidente, así, que durante el tiempo que se porte un aparato dental se deben intensificar las medidas de higiene y no limitarse únicamente el cepillado, ya que, pese a lo que se podía esperar, las cuantías de carga microbiana no difieren de forma significativa entre las rutinas de cepillado de dos y tres veces al día, lo cual podríamos atribuir a la tenacidad de la placa dental y a las altas tasas de crecimiento bacteriano.

⁵ El **test de suma de rangos de Wilcoxon** es una prueba no paramétrica que compara las medianas de dos muestras para determinar si hay diferencias significativas entre ellas, manteniendo como **hipótesis nula** que las muestras proceden de la misma población con igual distribución de probabilidad y, por tanto, la diferencia entre sus medianas es estadísticamente igual a cero. El **test de suma de rangos de Kruskal-Wallis** es la alternativa que aplicamos en los casos donde hay más de dos muestras aleatorias, como ocurre en los factores “consumo de tabaco” y “consumo de alcohol”, que subdividen la población original en cuatro muestras.

Por su parte, como la variable que cuantifica las bacterias fecales no es estrictamente continua, se ha optado por categorizarla y hacer una **tabla de contingencia** con la que hacemos una **prueba Chi-cuadrado** para comprobar el número de los individuos que hemos observado en cada categoría se corresponden con el número de individuos esperado bajo el supuesto de que la variable microbiológica no se ve afectada por determinado factor (**Tablas 4 a 7**). Con los β -hemolíticos se ha seguido exactamente la misma estrategia por tal motivo (**Tablas 8 a 11**).

Con este análisis, concluimos que **la cantidad de bacterias fecales recuperables de la boca disminuyen drásticamente en las personas que fuman (Tabla 6) y beben alcohol (Tabla 7) y aumenta entre los que se muerden las uñas (Tabla 4)**. Cabe señalar que los factores fumar y beber se encuentran correlacionados dentro de la muestra estudiada (**Tabla 13**).

El **aumento de bacterias fecales** asociado a **morderse las uñas** puede estar justificado en que las manos, sumado a un lavado irregular o poco eficaz de éstas, son precisamente uno de los principales vehículos de transmisión de bacterias fecales por la cantidad de superficies con las que entran en contacto, siendo además las uñas un foco potencial de enterobacterias debido a la suciedad que se queda acumulada en ellas.

También parece haber cierta correlación entre el número de bacterias fecales y la **ortodondia (Tabla 12)**, pero el análisis Chi-cuadrado no lo da por válido (**Tabla 5**). Esto podría deberse a que, cuando están presentes, las fecales forman parte de la microbiota mesófila aerobia (**Tabla 14**), aunque su presencia no esté directamente correlacionada con la ortodondia.

El efecto que el tabaco tiene sobre las fecales (y sobre las Gram negativas en general según el estudio de **Wu et al., 2016**) no es tan fácil de discutir, pero es probable que alguna de las muchas sustancias que componen su humo (alquitrán, nicotina, monóxido de carbono, bencenos...) tengan también acción tóxica sobre ellas que no parece existir sobre las Gram positivas estudiadas, en las que tampoco se ha detectado ningún efecto que las favorezca.

No se han detectado factores de influencia significativa sobre las β -hemolíticas (**Tabla 12**).

Tabla 0. Conclusiones	Consumo de tabaco	Consumo de alcohol	Cepillado	Ortodondia	Morderse las uñas
Mesófilos	No afecta	No afecta	No afecta	Aumenta	No afecta
α-hemolíticos	No afecta	No afecta	No afecta	Aumenta	No afecta
β-hemolíticos	No afecta	No afecta	No afecta	No afecta	No afecta
No hemolíticos	No afecta	No afecta	No afecta	No afecta	No afecta
Fecales	Disminuye	Disminuye	No afecta	No afecta	Aumenta

CONCLUSIONES

El consumo de tabaco y el consumo de alcohol aumentan los niveles a los que se encuentran bacterias fecales en la cavidad oral, cuya presencia está igual y directamente vinculada a la costumbre nerviosa de morderse las uñas. Asimismo, llevar ortodoncia aumenta notoriamente la carga bacteriana general de la boca. Parece que ninguno de los factores estudiados ha tenido incidencias en la presencia, ausencia o grado de desarrollo de bacterias β -hemolíticas orales. No hay diferencias en la carga microbiana de la boca ni en su composición en función de las distintas frecuencias de cepillado.

CONCLUSIÓNS

O consumo de tabaco e o consumo de alcohol aumentan os niveis ós que se atopan bacterias fecais na cavidade oral, estando a súa presenza igual e directamente vinculada á costume nerviosa de morderse as unllas. Así mesmo, levar ortodoncia aumenta notablemente carga bacteriana xeral da boca. Parece que ningún dos factores estudados tivo incidencias na presenza, ausencia ou grao de desenvolvemento de bacterias β -hemolíticas orais. Non hai diferencias na carga microbiana da boca nin na súa composición en función das distintas frecuencias de cepillado.

CONCLUSIONS

Tobacco consumption and alcohol consumption increase the levels that faecal bacteria are found in the oral cavity, whose presence is directly linked to the nervous habit of nails biting. Also, carry orthodontic notoriously increases the overall bacterial charge of the mouth. It seems that any of the studied factors had incidence in the presence, absence or degree of development of oral β -haemolytic bacteria. There is no differences in the microbial charge of the mouth or in their composition linked to the different frequencies of tooth brushing.

AGRADECIMIENTOS

Dejo constancia de mi profundo agradecimiento al Área de Microbiología del Departamento de Biología Celular, Molecular y Genética de la Universidad de Coruña y, en particular, a los doctores José Enrique Torres, por toda su atención, apoyo y ayuda como tutor en el desarrollo de este trabajo, y Ángeles Cid por sus clases magistrales de Microbiología Ambiental y Biotecnología. Asimismo, le debo este trabajo a la doctora Graciela Estévez, del Área de Estadística e Investigación Operativa del Departamento de Matemáticas de la Universidad de Coruña, por sus consejos y enseñanzas y nunca negarme el favor de atender mis dudas. Le doy las gracias también al doctor Emelino Robles, docente en el C.I.F.P Ánxel Casal, y al Área de Microbiología del CHUAC por su ayuda desinteresada al regalarme todas las placas de agar sangre con las que he trabajado; a mi compañero de mesa, Sergio Santaefemia, por haberme hecho tan agradables los dos meses de trabajo en el laboratorio; y a mi gran amigo Ricardo por, a pesar de la distancia, haberme apoyado, animado y sufrido día a día sin excepción.

Dedico esta memoria a todas las voluntarias que se ofrecieron generosamente a responder a mis preguntas y a darme una muestra de su boca para el experimento y a mis amigos de siempre, Tamara y Rubén, que comparten mi entusiasmo por la Microbiología.

ANEXO: TABLAS

Consumo de tabaco	Significado	Nº individuos muestrales
0	No fuma o hace más de una semana que no fuma	11
1	Fuma un cigarrillo al día de media	3
2	Fuma dos cigarrillos al día de media	3
3	Fuma tres o más cigarrillos al día de media	5
Consumo de alcohol	Significado	Nº individuos muestrales
0	Nunca bebe alcohol	9
1	Consume alcohol una vez a la semana de forma irregular	6
2	Consume alcohol una vez a la semana de forma regular	4
3	Consume alcohol más de una vez a la semana de forma regular	3
Cepillado	Significado	Nº individuos muestrales
2	Se cepilla dos veces al día	7
3	Se cepilla tres veces al día	15
Ortodoncia	Significado	Nº individuos muestrales
Sí	-	6
No	-	16
Morderse las uñas	Significado	Nº individuos muestrales
Sí	-	13
No	-	9

Interpretación de las cifras-etiqueta de nivel de cada factor y número de individuos
--

Variable	Consumo de tabaco	Mediana
log ₁₀ (Mesófilos)	0	5,680
	1	6,077
	2	5,908
	3	5,653
	Consumo de alcohol	Mediana
	0	5,911
	1	5,664
	2	5,940
	3	6,495
	Cepillado	Mediana
	2	5,653
	3	5,973
	Ortodoncia	Mediana
	Sí	6,598
	No	5,672
	Morderse las uñas	Mediana
Sí	5,908	
No	5,956	

Suma de rangos Kruskal-Wallis		
X ²	df	p-valor
2,571	3	0,461

Suma de rangos Kruskal-Wallis		
X ²	df	p-valor
0,961	3	0,809

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
36	0,267

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
5	5,093·10⁻⁴

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
59	1

Tabla 1. Test de sumas de rangos para la variable log₁₀(mesófilos)

log ₁₀ (alfa-hemolíticos)	Consumo de tabaco	Mediana
	0	5,518
	1	5,954
	2	5,724
	3	6,257
	Consumo de alcohol	Mediana
	0	5,518
	1	6,040
	2	5,902
	3	6,257
	Cepillado	Mediana
	2	6,103
	3	5,851
	Ortodoncia	Mediana
	Sí	6,359
	No	5,684
	Morderse las uñas	Mediana
Sí	5,954	
No	5,977	

Suma de rangos Kruskal-Wallis		
X ²	df	p-valor
2,015	3	0,568

Suma de rangos Kruskal-Wallis		
X ²	df	p-valor
2,043	3	0,562

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
64,5	0,417

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
16,5	0,022

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
68,5	0,525

Tabla 2. Test de sumas de rangos para la variable log₁₀(alfa-hemolíticos)

Variable	Consumo de tabaco	Mediana
log ₁₀ (no-hemolíticos)	0	4.903
	1	5.602
	2	6.127
	3	5.342
	Consumo de alcohol	Mediana
	0	5.301
	1	5.321
	2	5.278
	3	5.602
	Cepillado	Mediana
	2	5.000
	3	5.380
	Ortodoncia	Mediana
	Sí	5.428
	No	5.301
	Morderse las uñas	Mediana
	Sí	5.342
	No	5.301

Suma de rangos Kruskal-Wallis		
X ²	df	p-valor
6,803	3	0,077

Suma de rangos Kruskal-Wallis		
X ²	df	p-valor
2,115	3	0,549

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
27	0.077

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
33	0.284

Suma de rangos Wilcoxon	
W	p-valor
48.5	0.525

Tabla 3. Test de sumas de rangos para la variable log₁₀(no hemolíticos)

Tabla 4.

Fecales		Morderse las uñas		TOTAL
		No	Sí	
Más de cien ufc/mL	Obs	0,00	6,00	6
	Esp	2,45	3,55	
Menos de cien ufc/mL	Obs	2,00	4,00	6
	Esp	2,45	3,55	
Ninguna	Obs	7,00	3,00	10
	Esp	4,09	5,91	
TOTAL		9	13	22

$$X^2 = 7,796 \quad df = 2$$

p-valor = 0,019

Tabla 5.

Fecales		Ortodoncia		TOTAL
		No	Sí	
Más de cien ufc/mL	Obs	4,00	2,00	6
	Esp	4,36	1,64	
Menos de cien ufc/mL	Obs	5,00	1,00	6
	Esp	4,36	1,64	
Ninguna	Obs	7,00	3,00	10
	Esp	7,27	2,73	
TOTAL		16	6	22

$$X^2 = 0,489 \quad df = 2$$

p-valor = 0,782

Tabla 6.

Fecales		Consumo de tabaco				TOTAL
		0	1	2	3	
Más de cien ufc/mL	Obs	6,00	0,00	0,00	0,00	6
	Esp	3,00	0,82	0,82	1,36	
Menos de cien ufc/mL	Obs	4,00	0,00	1,00	1,00	6
	Esp	3,00	0,82	0,82	1,36	
Ninguna	Obs	1,00	3,00	2,00	4,00	10
	Esp	5,00	1,36	1,36	2,28	
TOTAL		11	3	3	5	22

$$X^2 = 14,062 \quad df = 6$$

p-valor = 0,029

Tabla 7.

Fecales		Consumo de alcohol				TOTAL
		0	1	2	3	
Más de cien ufc/mL	Obs	6,00	0,00	0,00	0,00	6
	Esp	2,45	1,91	0,82	0,82	
Menos de cien ufc/mL	Obs	2,00	3,00	1,00	0,00	6
	Esp	2,45	1,91	0,82	0,82	
Ninguna	Obs	1,00	3,00	3,00	3,00	10
	Esp	4,09	3,18	1,36	1,36	
TOTAL		9	6	4	3	3

$$X^2 = 14,150 \quad df = 6 \quad \mathbf{p\text{-valor} = 0,014}$$

Tabla 8.

Beta-hemolíticos		Morderse las uñas		TOTAL
		No	Sí	
Más de tres mil ufc/mL	Obs	1,00	3,00	3
	Esp	1,23	1,77	
Menos de tres mil ufc/mL	Obs	3,00	2,00	5
	Esp	2,05	2,95	
Ninguna	Obs	5,00	8,00	13
	Esp	5,32	7,68	
TOTAL		9	13	22

$$X^2 = 1,205 \quad df = 2 \quad p\text{-valor} = 0,547$$

Tabla 9.

Beta-hemolíticos		Ortodoncia		TOTAL
		No	Sí	
Más de tres mil ufc/mL	Obs	3,00	1,00	3
	Esp	2,18	0,82	
Menos de tres mil ufc/mL	Obs	5,00	0,00	5
	Esp	3,64	1,36	
Ninguna	Obs	8,00	5,00	13
	Esp	9,45	3,55	
TOTAL		16	6	22

$$X^2 = 2,706 \quad df = 2 \quad p\text{-valor} = 0,258$$

Tabla 10.

Beta-hemolíticos		Consumo de tabaco				TOTAL
		0	1	2	3	
Más de tres mil ufc/mL	Obs	2,00	1,00	1,00	0,00	3
	Esp	1,5	0,41	0,41	0,68	
Menos de tres mil ufc/mL	Obs	3,00	0,00	0,00	2,00	5
	Esp	2,5	0,68	0,68	1,14	
Ninguna	Obs	6,00	2,00	2,00	3,00	13
	Esp	6,5	1,77	1,77	2,96	
TOTAL		11	3	3	5	22

$$X^2 = 3,883 \quad df = 6 \quad p\text{-valor} = 0,691$$

Tabla 11.

Beta-hemolíticos		Consumo de alcohol				TOTAL
		0	1	2	3	
Más de tres mil ufc/mL	Obs	2,00	0,00	0,00	2,00	3
	Esp	1,23	0,82	0,54	0,41	
Menos de tres mil ufc/mL	Obs	1,00	3,00	0,00	1,00	5
	Esp	2,05	1,36	0,91	0,68	
Ninguna	Obs	6,00	3,00	4,00	0,00	13
	Esp	5,32	3,54	2,36	1,78	
TOTAL		9	6	4	3	22

$$X^2 = 3,883 \quad df = 6 \quad p\text{-valor} = 0,051$$

Tabla 12.
Correlaciones R^2 de Pearson

	Consumo de tabaco	Consumo de alcohol	Cepillado	Ortodoncia	Morderse las uñas
Mesófilos	0,109	0,056	0,225	0,758	-0,014
α -hemolíticos	0,069	0,329	-0,237	0,303	-0,263
β -hemolíticos	-0,039	0,323	-0,065	-0,018	0,074
No hemolíticos	0,306	0,008	0,318	0,190	0,315
Fecales	-0,445	-0,476	0,271	0,399	0,423

Significación de la correlación (p-valor pareado): < 0,01; < 0,05; < 0,07

Tabla 13.
Correlaciones
 R^2 de Pearson

	Consumo de tabaco	Consumo de alcohol	Cepillado	Ortodoncia	Morderse las uñas
Consumo de tabaco	1,000				
Consumo de alcohol	0,444	1,000			
Cepillado	-0,186	-0,429	1,000		
Ortodoncia	0,119	-0,217	0,318	1,000	
Morderse las uñas	-0,311	-0,398	0,324	0,094	1,000

Significación de la correlación (p-valor pareado): < 0,01; < 0,05; < 0,07

Tabla 14.
Correlaciones
 R^2 de Pearson

	Mesófilos	α -hemolíticos	β -hemolíticos	No hemolíticos	Fecales
Mesófilos	1,000				
α -hemolíticos	0.387	1,000			
β -hemolíticos	0.180	0.135	1,000		
No hemolíticos	0.161	-0.066	0.150	1,000	
Fecales	0.421	0.045	-0.129	0.026	1,000

FUENTES Y REFERENCIAS

1. CONANT, J. (2005). *Sanitation and Cleanliness for a Healthy Environment*. The Hesperian Foundation in collaboration with the United Nations Development Programme (UNDP). California, USA. [Documento en línea] Disponible en «http://hesperian.org/.../EHB_Sanitation_EN_watermark.pdf» [Consultado por última vez el 15/04/2016]
2. DAVIS, B. D.; DUBELCCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S. (1996) *Tratado de Microbiología*. 4ª edición. Masson. Barcelona.
3. GARCÍA, M. (2012) Comportamiento de los estreptococos beta-hemolíticos en escolares. *Sanidad Militar*, 68(1):17-21. | doi: 10.4321/S1887-85712012000100003
4. GOLDBERG, S.; CARDASH, H.; BROWNING, H.; SAHLY, H.; ROSENBERG, M. (1997) Isolation of Enterobacteriaceae from the mouth and potential association with malodor. *Journal Dentist Research*, 76(11):1770-1775. | doi: 10.1177/00220345970760110801
5. LIÉBANA UREÑA, J. (2010) *Microbiología oral*. Interamericana. 2ª edición. McGraw-Hill / Interamericana España.
6. KOLENBRANDER, P.E.; ANDERSEN, R.N.; BLEHERT, D.S.; EGLAND, P.G.; FOSTER, J.S.; PALMER JR.; R.J. (2002) Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 486-505. | doi: 10.1128/MMBR.66.3.486-505.2002
7. KUMAR, P.S.; MATTHEWS, C.R.; JOSHI, V.; DE JAGER, M.; ASPIRAS, M. (2011) Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms. *Infection and Immunity*, 79(11): 4730-4738. | doi: 10.1128/IAI.05371-11
8. MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V. and CLARK, D.P. (2003). *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ª Edición. Pearson Educación S.A. Madrid
9. MALTEZ THOMAS, A.; GLEBER-NETTO, F.O.; FERNANDES, G.R.; AMORIM, M.; BARBOSA, L.F.; NORONHA FRANCISCO, A.L.; GUERRA DE ANDRADE, A.; SETUBAL, J.C.; KOWALSKI, L.P.; NUNES, D.N.; DIAS-NETO, E. (2014) Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa biofilms. *BioMed Central Microbiology*. 14(250) [Epub] | doi: 10.1186/s12866-014-0250-2
10. MIKKELSEN, H.; DUCK, Z.; LILLEY, K.S.; WELCH, M. (2007) Interrelationships between Colonies, Biofilms, and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 189(6): 2411–2416. | doi: 10.1128/JB.01687-06
11. REDDY, S.; SANJAI, K.; KUMARASWAMY, J.; PAPAIAH, L. (2013) Oral carriage of enterobacteriaceae among school children chronic nail-biting habit. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 17(2): 163-168. | doi: 10.4103/0973-029X.119743
12. TAUB, B. (2016) Smoking alters the bacteria living in your mouth. IFLScience. [Enlace web] Disponible en «<http://www.iflscience.com/health-and-medicine/smoking-alters-bacteria-living-your-mouth/>» [Consultado por última vez el 08/04/2016]
13. WENNER, M. (2007) Humans carry more bacterial cells than human ones. *Scientific American, Inc.* [Enlace web] Disponible en «<http://www.scientificamerican.com/article/strange-but-true-humans-carry-more-bacterial-cells-than-human-ones/>» [Consultado por última vez el 02/05/2016]
14. WU, J; PETERS, B.A.; DOMINIANNI, C.; ZHANG, Y.; PEI, Z.; YANG, L.; MA, Y.; PURDUE, M.P.; JACOBS, E.J.; GAPSTUR, S.M.; LI, H.; ALEKSEYENKO, A.V.; HAYES, R.B.; AHN, J. (2016) *Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults*. The ISME Journal. [Epub ahead of print] | doi:10.1038/ismej.2016.37