

# Metabolitos de bacterias lácticas antagónicas al crecimiento de microorganismos cariogénicos

## *Antagonistic activity of lactic acid bacteria metabolites towards cariogenic microorganisms growth*

Presentado: 19 de septiembre de 2014

Aceptado: 27 de octubre de 2014

Cynthia Sin,<sup>a</sup> Olga Vasek,<sup>a</sup> Silvia Ortega<sup>b</sup><sup>a</sup>Biotecnología Microbiana para la Innovación Alimentaria (BiMIA), Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica, CONICET, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina<sup>b</sup>Facultad de Odontología, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

### Resumen

**Objetivo:** Aislar, purificar y conservar cepas de *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. de la cavidad bucal, y enfrentarlas “in vitro” a bacterias lácticas.

**Materiales y métodos:** Se seleccionaron individuos con caries activas y se recolectaron muestras de saliva. Para recuperar *Streptococcus* spp., se empleó medio Mitis Salivarius (Difco,™ Detroit, MI, Estados Unidos) y para *Lactobacillus* spp. se usó Rogosa (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia). Como cepas productoras de bacteriocinas, se utilizaron 7 cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 de *Leuconostoc mesenteroides* y 1 de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. La actividad antagónica de las bacterias lácticas al

crecimiento “in vitro” de bacterias cariogénicas se determinó con el método de difusión en agar.

**Resultado:** El desarrollo y la multiplicación de las cepas de *Streptococcus* spp. de origen bucal ensayadas se vieron afectados por la presencia de metabolitos generados por las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

**Conclusión:** El crecimiento de las cepas de *Streptococcus* spp. fue inhibido por efecto de *L. lactis* subsp. *lactis*.

**Palabras clave:** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, microorganismos cariogénicos, metabolitos antagónicos, bacterias lácticas.

### Abstract

**Aim:** To isolate, purify and preserve strains of *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. obtained from the oral cavity and ‘in vitro’ analyze their growth in the presence of lactic acid bacteria.

**Materials and methods:** Saliva samples were collected from patients with active caries lesions. Mitis-salivarius agar medium (Difco,™ Detroit, MI, USA) was used to recover *Streptococcus* spp. while Rogosa medium (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) was used for the *Lactobacillus* spp. 7 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, and 1 of *Lactococcus lactis* subsp.

*diacetylactis* were used as bacteriocin producers. Its antagonist activity against cariogenic bacterial growth was tested ‘in vitro’ using the agar diffusion method.

**Results:** The growth and the multiplication of oral *Streptococcus* spp. were affected due to the presence of metabolites produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

**Conclusion:** The growth of *Streptococcus* spp. strains is inhibited by the metabolites of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

**Key words:** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, cariogenic microorganisms, antagonistic metabolites, lactic bacteria.

## Introducción

La placa dental es un *biofilm* que se desarrolla naturalmente sobre la pieza dentaria. Son 700, aproximadamente, las especies bacterianas que componen este complejo ecosistema. Sus interacciones dan origen al *biofilm* (supra y subgingival, según su localización) y constituyen los agentes etiológicos principales de las enfermedades infecciosas orales, la caries dental y la enfermedad periodontal.<sup>1</sup>

La caries dental surge como consecuencia de cambios ecológicos en la cavidad bucal, debidos a múltiples factores en relación con el huésped y a la microbiota oral. Esta enfermedad de origen bacteriano se caracteriza por la desmineralización del esmalte dental, que suele ser resultado de la proliferación y la acción de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.<sup>2,3</sup>

Los bactericidas químicos y antibióticos empleados para prevenir las infecciones bacterianas a menudo generan disturbios en la microbiota de la cavidad oral y del tracto digestivo, lo cual favorece el desarrollo de resistencia en algunos microorganismos, por lo que pierden su efectividad. Un número muy pequeño de estudios ha abordado con éxito la búsqueda de agentes naturales para ser empleados como antimicrobianos contra patógenos orales.<sup>4,5</sup>

La bacterioterapia se basa en combatir las infecciones bucales mediante la administración de bacterias inocuas que producen bacteriocinas (o sustancias similares a bacteriocinas), o de alimentos probióticos que contienen microorganismos con habilidades particulares, los que, al ser suministrados en cantidades suficientes, dan lugar a efectos fisiológicos benéficos en la salud del huésped.<sup>6</sup>

Actualmente, probióticos y prebióticos son utilizados en la elaboración de alimentos con el fin de prevenir algunas enfermedades de los tractos intestinal o urinario, e infecciones vaginales, entre otras.<sup>7</sup> Hace algunas décadas, la terapia con antibióticos de las enfermedades bucales, principalmente de caries y periodontitis, fue reemplazada por el uso de algunos probióticos en el tratamiento de la caries.<sup>8</sup>

Las bacterias lácticas (BAL), consideradas esenciales durante centurias en la producción de alimentos fermentados, son sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por la FDA (Food and Drug Administration), la que resguarda su uso en la ingesta humana.<sup>9</sup> Este grupo de microorganismos despertó un interés creciente debido a que, mediante sus diferentes vías metabólicas, influyen en las características sensoriales de los alimentos, aumentan su valor nutricional por la producción "in situ" de vitaminas, otorgan beneficios adicionales a la salud humana gracias a sus propiedades pro-

bióticas, y generan metabolitos (como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo y bacteriocinas o sustancias parecidas a bacteriocinas) con efecto antagonista al crecimiento de microorganismos indeseables, tales como los microorganismos cariogénicos.<sup>10</sup>

Varios estudios obtuvieron resultados satisfactorios en la evaluación del antagonismo de cepas bacterianas contra el establecimiento de *Streptococcus mutans* en el *biofilm* dental.<sup>11-13</sup>

El objetivo de este trabajo fue aislar, purificar y conservar cepas de *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. de la cavidad bucal y enfrentarlas, "in vitro", a bacterias lácticas productoras de bacteriocinas.

## Materiales y métodos

**Población de estudio.** Se seleccionaron 15 individuos, de edades comprendidas entre los 18 y los 21 años, que presentaban caries activas. Los pacientes informaron su consentimiento según lo dispuesto por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), según resolución 126/11 CD. Se realizó la toma de muestras de saliva mediante autoestimulación por parte del paciente. Para su recolección se emplearon recipientes herméticos estériles. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración y procesadas en el mismo día.

**Microorganismos de origen bucal.** Para la recuperación de *Streptococcus* spp., se empleó medio Mitis Salivarius (Difco,™ Detroit, MI, Estados Unidos), y para la recuperación de *Lactobacillus* spp. se utilizó Rogosa (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia). Las muestras se sembraron por duplicado, utilizando la metodología de inoculación y vertido, y se incubaron durante 48 horas, a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%, v/v).

Las unidades formadoras de colonias (UFC) que presentaron caracteres típicos en medio agar Mitis Salivarius y en medio Rogosa, respectivamente, fueron examinadas en preparaciones en fresco y tinción de Gram.

Los microorganismos fueron purificados mediante tres pasajes sucesivos desde los respectivos medios sólidos hacia los líquidos. Su pureza se comprobó por microscopía. Los *Streptococcus* spp. fueron conservados en caldo Mitis Salivarius, y los *Lactobacillus* spp. en caldo M.R.S. (Britania, Buenos Aires, Argentina), a -20 °C, empleando glicerol (15%, v/v) como crioprotector.

**Bacterias lácticas de origen alimentario.** Como productoras de bacteriocinas, se utilizaron 7 cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 cepas de

*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y 1 cepa de *L. lactis* subsp. *diacetylactis*, todas autóctonas de Corrientes, y pertenecientes a la Colección Institucional de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE, aisladas del ambiente caseario. Las cepas se activaron por pasajes sucesivos en medio Elliker (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia), con incubación a 35 °C, durante 24 horas.

**Screening del efecto antibacteriano.** La actividad antagonista, “in vitro”, de las BAL al crecimiento de las bacterias cariogénicas se ensayó con el método de difusión en agar, para lo cual se colocaron 25 µl de cultivos crecidos de las BAL sobre discos de papel de filtro Whatman® n.º 1 (Buenos Aires, Argentina), de 0,55 cm de diámetro, ubicados en la superficie de medios de cultivo adecuados para las bacterias cariogénicas (Mitis Salivarius y Rogosa), en cajas de Petri previamente sembradas con 50 µl de cultivos *overnight* de las bacterias cariogénicas.<sup>14</sup> La superficie del agar vertido en las cajas de Petri se dejó solidificar y secar durante 15 minutos en ambiente estéril. Las cajas de Petri inoculadas se incubaron durante 24 horas, a la temperatura óptima de crecimiento (35 °C). Los diámetros de las zonas de inhibición (ZOI) se midieron con un vernier.

## Resultados

Para la observación macroscópica, se seleccionaron las colonias crecidas en medio Rogosa que presentaron las características típicas: forma circular, color amarillo, y 0,5-1,0 mm a 3,0 mm de diámetro; y las desarrolladas en medio Mitis Salivarius que observaron forma circular, color azul oscuro, y 0,5-1,0 mm a 3,0 mm de diámetro. El examen en fresco y tinción de Gram mostró que las células provenientes de las colonias amarillas se correspondían con bacilos pleomórficos Gram (+), y las de las colonias azules, con cocos de a pares o en cadenas Gram (+).

Se aislaron, purificaron y conservaron 8 cepas de *Streptococcus* spp. y 4 de *Lactobacillus* spp. de origen bucal.

El enfrentamiento de las cepas de origen bucal a las BAL arrojó resultados exitosos. Sólo el crecimiento de las cepas de *Streptococcus* spp. fue inhibido por efecto de *L. lactis* subsp. *lactis* (tabla 1).

Sólo 2 de las cepas de *Streptococcus* spp. de origen bucal (OD14 y OD15) mostraron ser sensibles a los metabolitos de 5 cepas (155, 157, 159, 163 y 164) de *L. lactis* subsp. *lactis* salvajes y autóctonas del nicho ecológico de Corrientes. Las zonas de inhibición generadas por la actividad de las bacterias lácticas ensayadas no destacaron ( $P < 0,05$ ) a ninguna de ellas frente a las 2 cepas sensibles (figura 1).

Tabla 1. Inhibición del crecimiento de estreptococos de origen bucal por acción de bacterias lácticas de origen alimentario.

Microorganismos de origen alimentario	Microorganismos de origen oral	ZOI (cm) $\bar{x} \pm DE$
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 155cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD14	1,33 ± 0,11
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 155cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD15	1,65 ± 0,07
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 157cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD14	1,4 ± 0,34
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 157cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD15	0,65 ± 0,91
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 159cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD14	1,03 ± 0,90
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 159cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD15	1,2 ± 0,28
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 163cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD14	1,53 ± 0,23
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 163cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD15	0,85 ± 1,2
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 164cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD14	1,63 ± 0,05
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 164cVCOR	<i>Str. spp.</i> OD15	1,65 ± 0,07

cVCOR: nomenclatura asignada a cocos lácticos de la Colección Institucional de bacterias lácticas autóctonas de Corrientes; DE: desviación estándar; OD: nomenclatura asignada a microorganismos autóctonos aislados del nicho ecológico bucal en Corrientes; ZOI: diámetro de la zona de inhibición medido en centímetros. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones independientes ± la desviación estándar.

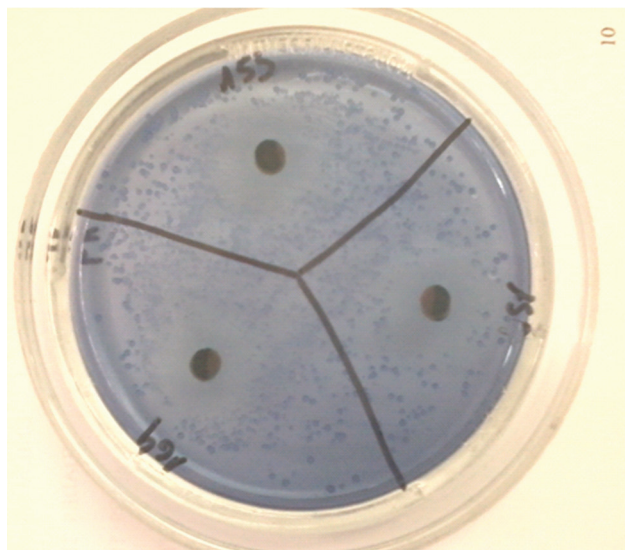


Figura 1. Cepa de *Streptococcus* spp. de origen bucal (OD14) sensible a metabolitos de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*.

## Discusión

Muchas investigaciones surgieron a partir de la necesidad de encontrar o desarrollar compuestos que puedan ser utilizados para el tratamiento o la prevención de la caries dental.

Estudios realizados recientemente seleccionaron 236 cepas de BAL de origen alimentario (quesos) para evaluar la actividad antimicrobiana frente a 10 cepas aisladas de cavidad bucal, 3 de las cuales eran Gram (-), y 7, Gram (+). Sólo 3 de las 236 cepas de origen alimentario aisladas (*Lactobacillus plantarum* ACA-DC 269, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 y *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198) produjeron actividad antimicrobiana frente a los patógenos orales. Los ensayos realizados indicaron que las cepas Gram (+) fueron sensibles a las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* y *Streptococcus* de origen alimentario; y que las cepas Gram (-), en cambio, no mostraron ser sensibles a las bacteriocinas producidas por las BAL utilizadas.<sup>15</sup>

Otro estudio utilizó cepas de *Leuconostoc gelidum* ATCC 49366, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ATCC 19254 y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293, todas productoras de dextranos a partir de sacarosa, para evidenciar “in vitro” los efectos inhibidores de la formación del *biofilm* y la proliferación de cepas de *S. mutans*, también productoras de polímeros solubles similares a dextranos. El autor concluyó que la inhibición de la formación de *biofilm* por *S. mutans* se produjo debido a una competencia por el espacio físico de parte de los polímeros producidos por las cepas de *Leuconostoc*s.<sup>16</sup>

También se utilizaron cepas de *Weissella cibaria*, comúnmente encontradas en productos alimenticios fermentados, que fueron aisladas de la cavidad bucal de niños sanos. Los ensayos realizados evidenciaron inhibición de la proliferación y la formación de biopelículas por parte de *Streptococcus mutans*, tanto “in vivo” como “in vitro”. Aparentemente, la inhibición de estos microorganismos cariogénicos y periodontopatógenos, tales como *Fusobacterium nucleatum*, se debería a la coagregación de *Weissella cibaria* en sitios específicos de *Fusobacterium nucleatum* y a su producción de peróxido de hidrógeno.<sup>10,17</sup>

Experiencias de administración por vía oral de productos lácteos (como yogur) con cepas de *L. reuteri*, *L. rhamnosus* GG y *L. casei* mostraron un elevado potencial para inhibir el crecimiento de estreptococos orales, particularmente de los de la especie *mutans*.<sup>18,19</sup>

## Conclusión

El desarrollo y la multiplicación de las cepas de *Streptococcus* spp. de origen bucal ensayadas son afectados por la presencia de metabolitos generados por las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* 155c-157c-159c-163c-164c cVCOR.

Estudios adicionales permitirán tipificar las cepas 14OD y 15OD con métodos moleculares e identificar el producto generado por las BAL y su mecanismo de acción frente a patógenos orales.

**Agradecimientos:** A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste por la financiación de este proyecto en marcha.

## Referencias

1. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr., Rickard AH, Jakubovics N, Chalmers NS, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000;2006;42:47-79.
2. Bonifait L, Chandad F, Grenier D. Probiotics for oral health: myth or reality? *J Can Dent Assoc* 2009;75:585-8. [Disponible en: [www.cda-adc.ca/jcda/vol-75/issue-8/585.pdf](http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-75/issue-8/585.pdf)].
3. Acosta GE. Inmunización contra la caries. *Rev Mex Odontol Clin* 2006;1:26-8. [Disponible en: [goo.gl/2O8XQx](http://goo.gl/2O8XQx) ([www.imbiomed.com.mx](http://www.imbiomed.com.mx))].
4. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc* 2006; 137:1649-57. [Disponible en: [www.people.vcu.edu/~albest/DENS580/pdfs/Anti-plaque%20meta-analysis.pdf](http://www.people.vcu.edu/~albest/DENS580/pdfs/Anti-plaque%20meta-analysis.pdf)].
5. Daglia M, Papetti A, Grisoli P, Aceti C, Dacarro C, Gazzani G. Antibacterial activity of red and white wine against oral Streptococci. *J Agric Food Chem* 2007;55:5038-41. [Disponible en: [pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf070352q](http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf070352q)].
6. Pérez Luyo A. Probióticos: ¿una nueva alternativa en la prevención de la caries dental? *Rev Estomatol Herediana* 2008;18:65-8.



7. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:658-61. [Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207122/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207122/)].
8. Hillman JD. Genetically modified Streptococcus mutans for the prevention of dental caries. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002;82:361-6. [Disponible en: [link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1020695902160](http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1020695902160)].
9. U.S. Food and Drug Administration. Microorganisms & microbial-derived ingredients used in food (Partial list). [Disponible en: [www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm](http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm)].
10. Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *J Oral Microbiol* 2009. [Disponible en: [www.journaloforalmicrobiology.net/index.php/jom/article/view/1949](http://www.journaloforalmicrobiology.net/index.php/jom/article/view/1949)].
11. Petti S, Tarsitani G, D'Arca AS. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Arch Oral Biol* 2001;46:705-9. [Disponible en: [goo.gl/PUla4Y](http://goo.gl/PUla4Y) (<http://www.aobjournal.com>)].
12. Chung J, Ha ES, Park HR, Kim S. Isolation and characterization of Lactobacillus species inhibiting the formation of Streptococcus mutans biofilm. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:214-6. [Disponible en: [goo.gl/IL1p9H](http://goo.gl/IL1p9H) ([www.readcube.com](http://www.readcube.com))].
13. Simark Mattsson C, Emilson CG, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci* 2007;115:308-14.
14. Ortez JH. Disk diffusion testing. En: Coyle MB (ed.). *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. American Society for Microbiology - Organización Panamericana de la Salud. 2005:39-52.
15. Zoumpopoulou G, Pepelassi E, Papaioannou W, Georgalaki M, Maragkoudakis PA, Tarantilis PA, et al. Incidence of bacteriocins produced by food-related lactic acid bacteria active towards oral pathogens. *Int J Mol Sci* 2013;14:4640-54. [Disponible en: [www.mdpi.com/1422-0067/14/3/4640/htm](http://www.mdpi.com/1422-0067/14/3/4640/htm)].
16. Kang MS, Kang IC, Kim SM, et al. Effect of Leuconostoc spp. on the formation of Streptococcus mutans biofilm. *J Microbiol* 2007;45:291-4.
17. Kang MS, Chung J, Kim SM, Yang KH, Oh JS. Efecto de Weissella cibaria en la formación de Streptococcus mutans biopelícula. *Caries Res* 2006;40:418-25. [Disponible en: [www.karger.com/Article/FullText/94288](http://www.karger.com/Article/FullText/94288)].
18. Sudhakar RR, Swapna LA, Ramesh T, et al. Bacteria in oral health - Probiotics and prebiotics. A review. *Int J Biol Med Res* 2011;2:1226-33. [Disponible en: [goo.gl/xsYNYE](http://goo.gl/xsYNYE) ([www.biomedscidirect.com](http://www.biomedscidirect.com))].
19. Muñoz Salas K, Alarcón Palacios M. Effect of probiotics on periodontal conditions. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 2010;3:136-9. [Disponible en: [www.scielo.cl/pdf/piro/v3n3/art07.pdf](http://www.scielo.cl/pdf/piro/v3n3/art07.pdf)].

Contacto:

CYNTHIA SIN

[cynthya\\_cysin21@hotmail.com](mailto:cynthya_cysin21@hotmail.com)

Barrio Laguna Seca, 84 viviendas, monobloc A

1.º piso, depto 2 (CP3400)

Corrientes, Argentina