

AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE DIFERENTES ESPECIES DE LACTOBACILLUS DE LA CAVIDAD ORAL

Dra. Virginia Papone Yorio*

Palabras claves: Lactobacilos, especies

INTRODUCCION

Diversas especies del género *Lactobacillus* forman parte de la flora normal de la cavidad bucal. La relación de este grupo de microorganismos con el desarrollo de la caries dental ha sido planteada en numerosos trabajos científicos a lo largo de los años (3-5-6-15). Existe gran número de publicaciones relacionadas con la recuperación *in vitro* y cuantificación de estos gémenes en la saliva (1-2-7-12-22-23-24-25).

En el momento actual, el medio utilizado más frecuentemente con esta finalidad de cuantificación es el medio selectivo de Rogosa (20). Al presente se ha planteado que el rol cariogénico de estos microorganismos sería desempeñado en asociación con *Streptococcus* del grupo mutans (15) y también que este rol sería desempeñado fundamentalmente por algunas especies del género en particular (16).

Consideramos de interés trabajar con el medio de Rogosa, estableciendo una correlación entre los morfotipos coloniales observados en condiciones standarizadas y las diversas especies del género *Lactobacillus*. Se planteó el objetivo de establecer patrones de lectura que permitan obtener, con un margen de seguridad ra-

* Prof. Adjunta Cátedra de Microbiología
Facultad de Odontología
Universidad de la República Oriental del Uruguay

zonable una identificación presuntiva, en base a la morfología colonial. Si es posible realizar una especiación presuntiva, puede incluirse este análisis en los estudios cuantitativos para lactobacilos que se utilizan para valoración de riesgo en cariología.

MATERIAL Y METODOS

Colección y cultivo de las muestras: Se trabajó con ciento veinte muestras de saliva obtenidas de una población de individuos entre 14 y 60 años, los cuales fueron seleccionados al azar para este estudio. Ninguno presentaba aparatos de ortodoncia, pero 18 presentaban prótesis removibles. Las muestras de saliva fueron recolectadas en frascos estériles, luego de diluir las mismas en solución buffer de fosfatos (0,05M+0,4% ClK: $K_2HPO_4+K_2HPO_4+ClK$). Se utilizaron placas de Petri de 90 mm de diámetro con aproximadamente 20 cc de medio de Rogosa (20), el cual fue usado con no más de 48 horas de preparación. La siembra de saliva se realizó con pipeta y la extensión de la misma con varilla de vidrio. Las muestras fueron incubadas en atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C durante 48 horas en recipientes sellados.

Lectura e identificación: La lectura se realizó con lupa con aumento de 25 x (Fig. 1-3-7-9-11-15-17) y 40 x (Fig. 5) mediante iluminación reflejada e inferior. Cada morfotipo fue estudiado luego de un nuevo reaislamiento y pasaje de agar sangre, con técnica de Gram y test bioquímicos (9-14). Los test bioquímicos se realizaron usando un medio base (tryptosa, ClNa, L. cistina, rojo fenol) esterilizado con el agregado de los hidratos de carbono a usar. Los mismos fueron colocados en tubos sellados con

vaselina estéril. Las bioquímicas se leyeron a las 24 horas de incubación anaerobia.

RESULTADOS

Se realizaron los estudios de los siguientes morfotipos.

Colonia 1. - Colonia de 1 a 2 mm de diámetro, convexa, opaca, brillante, superficie lisa, bordes regulares, blanquecina de consistencia mucoide. Al Gram se observaron bacilos Gram+ con bordes redondeados formando acúmulos (Fig. 1 y 2). De acuerdo a la morfología de los test bioquímicos este morfotipo corresponde a *L. casei* subsp. *ramnosus* (Tabla 1).

Colonia 2. - Colonia de 1 a 2 mm de diámetro, convexa, opaca, brillante, superficie lisa, bordes regulares, blanca amarillenta, consistencia mucoide. Al Gram se observaron bacilos Gram+ de bordes ligeramente cuadrados aislados o en cadenas (Fig. 3 y 4). De acuerdo a la morfología microscópica y macroscópica, y de acuerdo a los resultados de los test bioquímicos, este morfotipo corresponde a *L. casei* subsp. *casei* (Tabla 1).

Colonia 3. - Colonia de 2 mm de diámetro, forma irregular, brillante, opaca, superficie lisa, bordes irregulares, tipo rizoide, ligeramente amarillenta, consistencia mucoide. Al Gram se presentan como bacilos Gram+ que varían en tamaño de cortos a largos, aislados o en acúmulos (fig. 5 y 6). De acuerdo a la morfología microscópica, macroscópica y a los resultados de los test bioquímicos, este morfotipo corresponde a *L. casei* subsp. *tolerans* (Tabla 1).

Colonia 4 - Colonia de 1 a 2 mm de diámetro, forma regular, bordes irregulares, plana con ligero mamelón central o con depresión central, mate, transparente, superficie rugosa, consistencia mucoide. Al Gram observamos bacilos Gram+ con bordes redondeados, aislados, en pares o en cadenas cortas (Fig. 7 y 8). De acuerdo a la morfología microscópica, macroscópica y los test bioquímicos este morfotipo corresponde a *L. acidophilus* (Tabla 1)

Colonia 5.- Colonia de 2 mm de diámetro, convexa con mamelón central, bordes regulares, superficie lisa, opaca, brillante, blanquecina, de consistencia mucoide. Al Gram se observan como bacilos Gram+ ligeramente afinados, aislados o en pares (Fig. 9 y 10). De acuerdo a la morfología y a los test bioquímicos este morfotipo corresponde a *L. fermentum* (Tabla 1).

Colonia 6. - Colonia de 1 a 2 mm de diámetro, convexa aplanada, bordes regulares, superficie lisa, ligeramente opaca, brillante, presentando en su estructura interna círculos concéntricos, consistencia mucoide. Al Gram son bacilos Gram+ con bordes redondeados aislados o en cadenas cortas. (Fig. 11 y 12). De acuerdo a la morfología y a los test bioquímicos este morfotipo corresponde a *L. buchneri* (Tabla 1).

Colonia 7. - Colonia de 1 a 2 mm de diámetro, plana, con bordes regulares, superficie lisa, opaca, brillante, blanquecina, consistencia mucoide. Al Gram observamos bacilos Gram+ cortos y largos con bordes ligeramente rectos, aislados, en pares y en cadenas (Fig. 13 y 14). De acuerdo a la morfología microscópica, macroscópica y test bioquímicos este morfotipo correspon-

de a *L. plantarum* (Tabla 1).

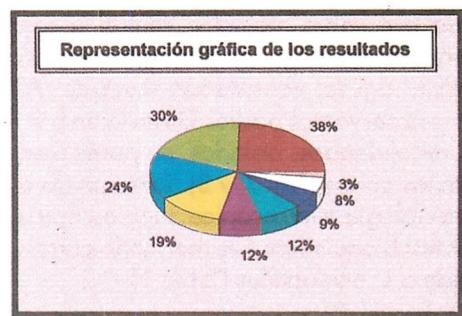
Colonia 8. - Colonia de 1 a 1,5 mm de diámetro, plana, transparente, brillante iridiscente, con bordes irregulares y de consistencia mucoide. Al Gram observamos bacilos Gram+ largos y finos, aislados o formando cadenas (Fig. 15 y 16). De acuerdo a la morfología y test bioquímicos este morfotipo corresponde a *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. (Tabla 1).

Colonia 9.- Colonia de 2 mm de diámetro ligeramente mamelonada, con bordes irregulares, ligeramente opaca en su porción central y transparente en sus bordes, brillante, superficie lisa, consistencia mucoide. Al Gram son bacilos Gram+ largos y finos aislados o formando cadenas (Fig. 17 y 18). Realizados los test bioquímicos este morfotipo podemos correlacionarlo con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Tabla 1).

De las muestras de saliva de los 120 individuos estudiados, 18 no presentaban re cuentos de lactobacilos. De las 102 muestras restantes estudiamos los morfotipos y las bioquímicas correspondientes de los lactobacilos encontrados con mayor frecuencia. Correlacionando los morfotipos con las distintas especies de lactobacilos, concluimos en que *L. casei* subsp. *rhamnosus* se encontraron en el 38% de las muestras de saliva; *L. acidophilus* en el 30%; *L. casei* subsp. *casei* en el 24%; *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* en el 19%; *L. plantarum* en el 12%; *L. buchneri* en el 12%; *L. fermentum* en el 9%; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en el 8% y *L. casei* subsp. *tolerans* en el 3% de las mismas.

LACTOBACILOS

1. *L. casei rhamnosus* 38%
2. *L. acidophilus* 30%
3. *L. casei casei* 24%
4. *L. delb. delbrueckii* 19%
5. *L. plantarum* 12%
6. *L. buchneri* 12%
7. *L. fermentum* 9%
8. *L. delb. bulgaricus* 8%
9. *L. casei tolerans* 3%



	celobiosa	arabinosa	lactosa	maltoza	manitol	manosa	melezitosa	ramnosa	ribosa	salicin	sorbitol	trealosa	rafinosa	xilosa
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	--	-	-	-
<i>L. fermentum</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>L. buchneri</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>L. plantarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 1. Fermentación de carbohidratos de distintas especies del género *Lactobacillus* (Berguey's Manual of determinative Bacteriology 1986).

DISCUSION

Con los resultados obtenidos consideramos que puede establecerse una correlación razonablemente estable entre los morfotipos y las especies de lactobacilos estudiadas. Para ello es necesario estandarizar la técnica, trabajando con el mismo tipo de placas, teniendo en cuenta el tiempo de preparación del medio de cultivo utilizado, la técnica de sembrado, el tiempo en las lecturas y la iluminación utilizada.

Estimamos que el aislamiento de las diferentes subespecies de lactobacilos fue interesante y gratificante, pero es de destacar que solamente estudiando las diferentes especies de lactobacilos es suficiente para integrarlas a los test predictivos tradicionales, elemento importante que nos abre perspectivas en nuestros estudios. Existen especies de lactobacilos íntimamente relacionados con la carie dental (*L. casei*-*L. acidophilus*), por lo que un recuento alto de los mismos, puede sugerirnos que estamos realmente frente a un paciente de riesgo en cariología.

Aunque los resultados fueron favorables en lo que concierne a la correlación entre los morfocitos y las diferentes especies de lactobacilos, se plantearon algunas dificultades con las lecturas de los test bioquímicos, los cuales tuvieron que ser leídos siempre con luz natural para interpretar correctamente los resultados.

CONCLUSIONES

El presente trabajo aporta información sobre las diversas especies de *Lactobacillus* que integran la flora de la cavidad bucal.

El análisis de las lecturas de las diversas morfologías coloniales observadas, y de los test bioquímicos correspondientes indica una correlación estable (en condiciones standarizadas de cultivo, tiempo de incubación y condiciones de lectura), entre los resultados de ambos estudios. De modo que se ha establecido como posible y no muy complejo la determinación, por lectura directa, con lupa de la o las especies predominantes en muestras de saliva. Esta información puede sumarse a los datos de recuento de *Lactobacillus*, en los estudios microbiológicos de campo. La relevancia de este aporte podrá ser evaluada en el análisis de este tipo de estudios.

RESUMEN

El estudio de los gérmenes del género *Lactobacillus* de la cavidad oral ha sido principalmente orientado al desarrollo e interpretación de test destinados a la cuantificación de los mismos. Consideramos de interés profundizar en el conocimiento de las características de la colonización de estos microorganismos con la puesta a punto de las técnicas de identificación a nivel de especie. En una segunda instancia se planteó la posibilidad de correlacionar los morfotipos coloniales obtenidos habitualmente en el medio de Rogosa y los resultados de la especiación. Se estudiaron 120 muestras de saliva, con técnicas de cultivo en superficie y cuantificación. Se aislaron *Lactobacillus* en

102 muestras y de todas ellas se realizó estudio de los morfotipos y especiación de los mismos. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* (en ese orden) fueron las especies aisladas con mayor frecuencia.

Es posible, trabajando en condiciones standarizadas, establecer una correlación entre los diversos morfotipos que se observan en el medio de Rogosa y las especies de aislamiento más frecuente. Esto permite manejar información adicional en los resultados de los test predictivos de recuento en placa de *Lactobacillus*.

SUMMARY

The study of *Lactobacillus* germs of the oral cavity, has been principally oriented to the development and interpretation of test appointed to the recount of them. We consider it is much of interest to explore in the knowledge of characteristics of colonization of these microorganisms, putting up techniques of identification of species. In a second instance, we tried to make the correlation of colony morphotypes

usually obtained at Rogosa medium and the results of the species study.

120 saliva samples were studied with superficial culture techniques and recount. *Lactobacillus* were isolated in 102 samples and we studied the morphotypes and species of all of them. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* (in this order) were the species isolated with more frequency.

It is possible, working in standarized conditions, to find a correlation between the different morphotypes that can be seen in the Rogosa medium and the most frequent species of isolation. This allows to manage additional information in the results of *Lactobacillus* recount, of predictive test in plaque.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la técnica preparadora Sra. Mirta Ruibal la valiosa colaboración prestada en este trabajo, así como también al personal del Servicio Odontológico de la Cooperativa de la Previsión Social.

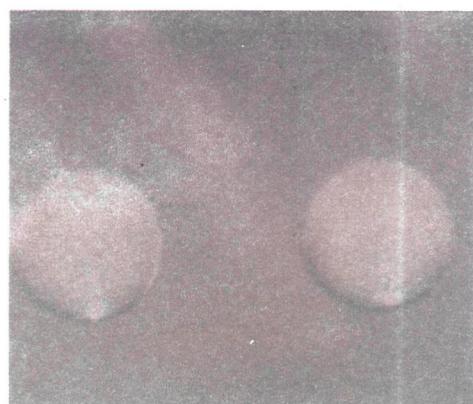


Fig. 1 Colonias de *L. casei* subsp. *rhamnosus* en medio de Rogosa

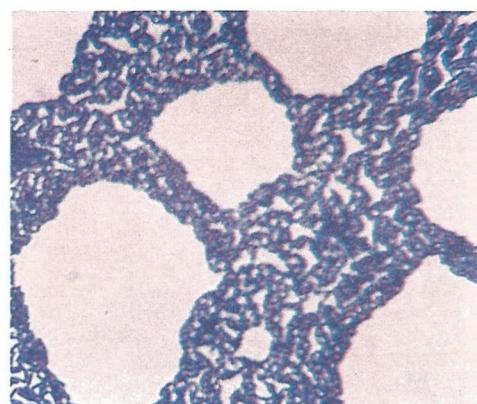


Fig. 2 Coloración de Gram de *L. casei* subsp. *rhamnosus*



Fig. 3 Colonias de *L. casei* subsp. *casei* en medio de Rogosa



Fig. 4 Coloración de Gram de *L. casei* subsp. *casei*

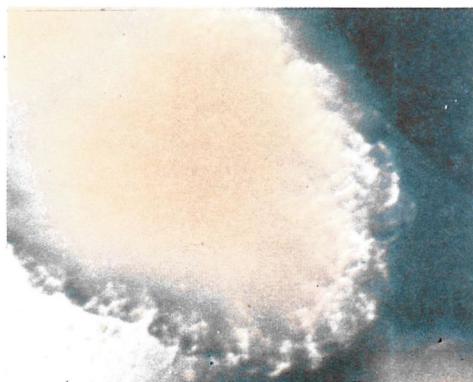


Fig. 5 Colonia de *L. casei* subsp. *tolerans* en medio de Rogosa

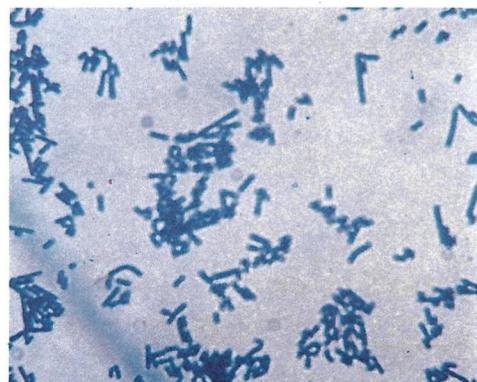


Fig. 6 Coloración de Gram de *L. casei* subsp. *tolerans*

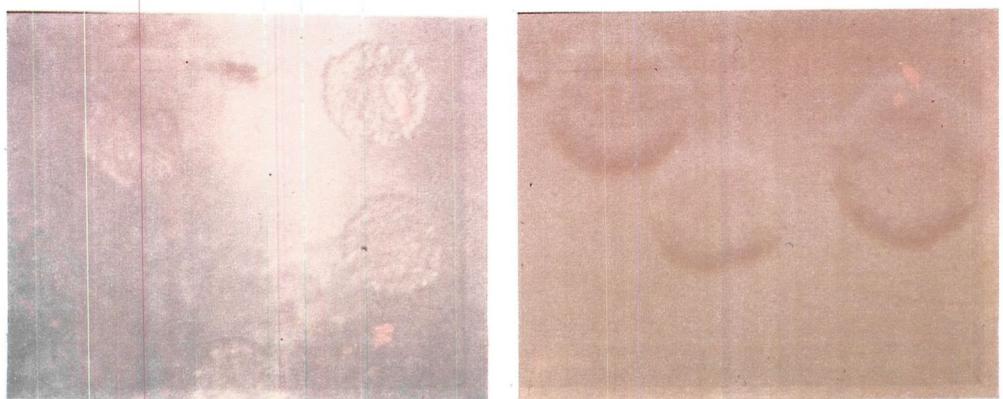


Fig. 7 Colonias de *L. acidophilus* en medio de Rogosa

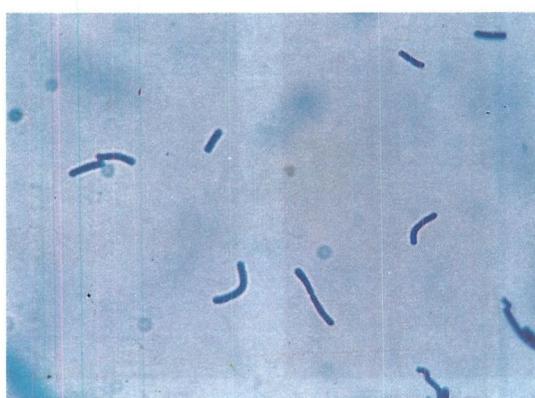


Fig. 8 Colotación de Gram de *L. acidophilus*

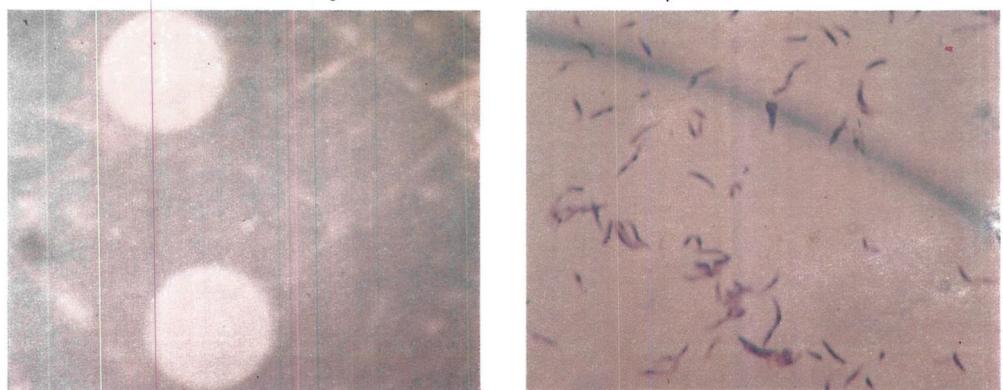


Fig. 9 Colonias de *L. fermentum* en medio de Rogosa



Fig. 10 Coloración de Gram de *L. fermentum*

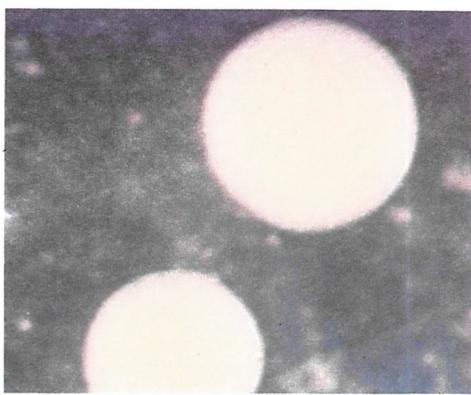


Fig. 11 Colonias de *L. buchneri* en medio de Rogosa

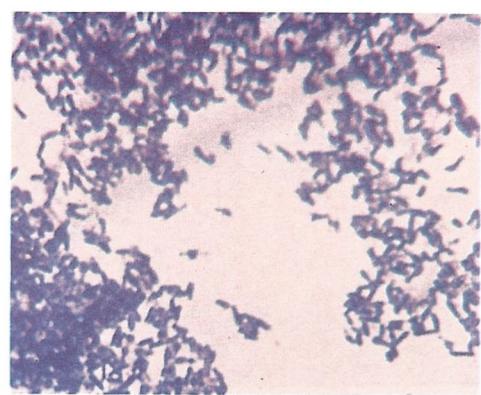


Fig. 12 Coloración de Gram de *L. buchneri*

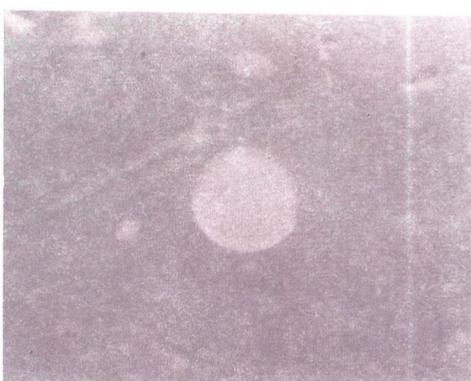


Fig. 13 Colonias de *L. plantarum* en medio de Rogosa



Fig. 14 Coloración de Gram en *L. plantarum*

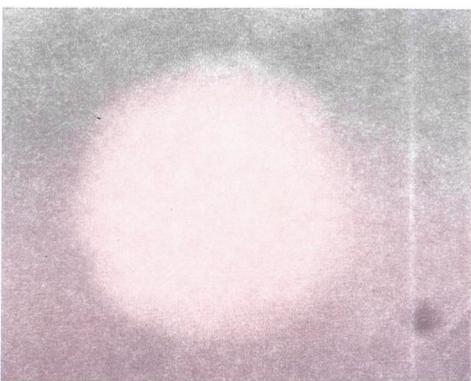


Fig. 15 Colonia de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* en medio de Rogosa



Fig. 16 Coloración de Gram de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*



Fig. 17 Colonias de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en medio de Rogosa

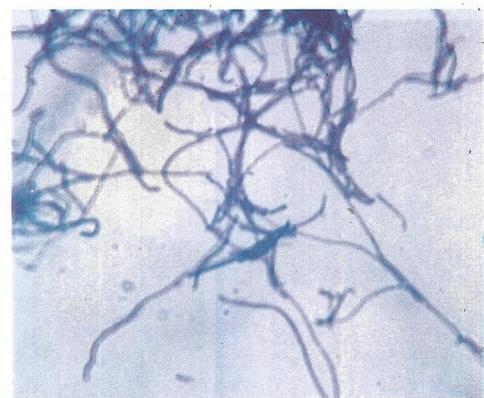


Fig. 18 Coloración de Gram de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

BIBLIOGRAFIA

1. Alaluusua, S. Salivary counts of mutans Streptococci and Lactobacilli and past caries experience in caries prediction. *Caries Res.* 1993; 27 (suppl): 68-71.
2. Alaluusua, S. ; Kleemola, E.; Grönroos, L.; Evalahti, M. Salivary caries related test as predictors of future caries increment in teenagers. A three year longitudinal study. *Oral Microbiol. Inmunol.* 1990; 5: 77-81.
3. Brathall D. Caries, views and perspectives. *Scand. J. Dent. Res.* 1992; 100: 47-51.
4. Burt, B. Epidemiología de la caries dental, en Silverstone, L.M.; Johnson, N.W.; Hardie, J. M. *Caries dental: etiología, patología y prevención*. Williams ed. Londres, 1981; 12-30.
5. Edwardsson, S. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odont. Rev.* 1974; 25: (suppl):32.
6. Fitzgerald, R.; Adams, B.; Fitzgerald, D. Cariogenicity fo human plaque lactobacilli in gnabiotic rats. *J. Dent. Res.* 1981; 60:919.
7. Gómez, J. Dental caries and mutans streptococci in selected groups of urban and native Indian schoolchildren in México. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1991; 19:98-10.
8. Hamilton, I.; Boyar, R.; Bowden, G. Influence of pH and fluoride on properties an oral strain of *L. casei* grown in continuous culture. *Inf. Immun.* 1985; 48: 664-670.
9. Holt, J.; Krieg, N.' Sneath, P. *Berguey's Manual of determinative Bacteriology* 9th. ed. William and Wilkins; Londres, 1993.
10. Ikeda, J.; Sandham, H.; Bradley, E. Changes in St. mutans and lactobacilli in relation to the initiation of dental caries in Negro children. *Archs. Oral Biol.* 1973; 18: 555.
11. Klock, B.; Krassse, B. Effect of caries preventive measures in children with high numbers of St. mutans and lactobacilli, *Scand. J. Dent. Res.* 1978; 86: 221.
12. Köhler, B. and Bjarnason, S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11 and 12 year old Icelandic children. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1987; 15: 289-292.
13. Köhler, B.; Andreén, I.; Johnsson, B. The earlier the colonization of mutans streptococci the higher the caries prevalence. *Oral Microbiol. Immunol.* 1988; 3: 14-17.
14. Krieg, N.; Holt, J. *Berguey's Manual of Systematic Bacteriology* 9th. William and Wilkins; Londres, 1986.
15. Loesche, W. Dental caries: a treatable infection. Charles C. Thomas; USA, 1982.
16. Loesche, W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews.* 1986; 50: 353-380.
17. Loesche, W.; Hockett, R.; Syed, S. The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjets. *Archs. Oral. Biol.* 1972; 17: 1311-1323.

18. Papone, V. Test predictivos de caries en base al estudio de lactobacilos. *Odontología de Postgrado*, 1988; 2: 18-23.
19. Papone, V.; Zinemanas, E. Evaluación de un nuevo test colorimétrico para determinar la presencia de lactobacilos en saliva. *An. Fac. Odont.* 1990; 26: 43-48.
20. Rogosa, M.; Mitchel, R.; Wiseman, A. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J. Dent. Res.* 1951; 30: 682.
21. Staat, R. Levels on the quantity and microbial compstion of the human dental plaque. *J. Dent. Res.* 1975; 54: 872.
22. Stecksen, B. Salivary counts of lactobacilli and Strepococci mutans in caries prediction. *Scand. J. Den. Res.* 1985; 93: 204.
23. Steinle, S.; Madonia, J.; Ranhn, H. Relationship of lactobacilli to the carious lesions. *J. Dent. Res.* 1967; 46: 191.
24. Westergren, G.' Krasse, B. Evaluation of a micro method for determination of St. mutans and lactobacilli infections. *J. Clin. Microbiol.* 1978; 7: 82-83.
25. Zickert, I.; Emilson, C.; Krasse, B. *Streptococcus mutans, lactobacillus and dental health in 13 to 14 year old Swedish children. Community Dent. Oral Epidemiol.* 1982; 10: 77-81.
26. Zickert, I.; Emilson, C.; Krasse, B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. *Inf. Immun.* 1983; 39: 982-985.