

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Tecnologia de Fermentações

Cultivo de bactérias ácido-láticas e determinação do potencial
bacteriocinogênico no controle de patógenos bucais

AMANDA ROMANA SANTOS DA SILVA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica e Farmacêutica.

Área de concentração: Tecnologia de Fermentações

Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos para obtenção e aplicação de bioprodutos.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Tecnologia de Fermentações

Cultivo de bactérias ácido-láticas e determinação do potencial
bacteriocinogênico no controle de patógenos bucais

AMANDA ROMANA SANTOS DA SILVA

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica e Farmacêutica.

Área de concentração: Tecnologia de Fermentações

Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos para obtenção e aplicação de bioprodutos.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d586c da Silva, Amanda Romana Santos
Cultivo de bactérias ácido-láticas e determinação do potencial bacteriocingênico no controle de patógenos bucais / Amanda Romana Santos da Silva. - São Paulo, 2023.
58 p. + Cinquenta e oito

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: de Souza Oliveira, Ricardo Pinheiro

1. Probióticos. 2. Microbiologia. 3. Odontologia. 4. Cárie. 5. Biotecnologia. I. T. II. de Souza Oliveira, Ricardo Pinheiro, orientador.

Amanda Romana Santos da Silva

**Cultivo de bactérias ácido-láticas e determinação do potencial
bacteriocinogênico no controle de patógenos bucais**

Comissão Julgadora da Dissertação/Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Prof. Dr. Orientador Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira/presidente

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Prof. Dr. José Manuel Domínguez

Prof. Dr. Luis Augusto Nero

São Paulo, 27 de Abril de 2023.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Exu, pois sem Exu não se faz nada. Agradeço aos meus guias espirituais que me sustentaram até aqui. Agradeço aos meus pais Ângela e Sales que sempre me proporcionaram uma boa educação, amor e respeito. Agradeço também ao meu companheiro Maurício Pessoa e à nossa filha Beatriz que foram pacientes e me apoiaram em todos os momentos.

Agradeço ao meu parceiro de vida e de laboratório Elionio Frota que me mostrou o verdadeiro significado da amizade e que amigos nunca soltam a sua mão.

Agradeço ao prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira pelos anos de orientação e oportunidade concedida.

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida processo número 142192/2019-8.

Fortis Fortuna Adiuvat

Provérbio latino

RESUMO

SILVA, A. R. S. **Cultivo de bactérias ácido-láticas e determinação do potencial bacteriocinogênico no controle de patógenos bucais**. 2022. 55f. Tese (Doutorado em Tecnologia bioquímica farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A utilização de microrganismos probióticos na prevenção e tratamento de infecções bacterianas humano vem sendo considerada uma alternativa eficiente frente ao uso de antibióticos. Adicionalmente, estudos recentes demonstram que determinadas biomoléculas produzidas por estes microrganismos, tais como bacteriocinas, vitaminas, ácidos graxos, exopolissacarídeos, entre outras, proporcionam a melhora da imunidade e do desenvolvimento de seus hospedeiros. Os microrganismos probióticos mais utilizados atualmente nas indústrias de alimentos e farmacêuticas são os pertencentes ao grupo de bactérias ácido-láticas (BALs), uma vez que são consideradas seguras pelos órgãos reguladores nesta área. A cavidade oral está entre os diferentes locais do organismo que apresenta potencial de aplicação de bactérias ácido-láticas (BAL) probióticas. Diversos estudos clínicos já mostraram a diminuição da prevalência de inflamações gengivais (periodontites) e candidíases orais em adultos que faziam uso frequente de gomas contendo microrganismos probióticos. No entanto, sabe-se que os efeitos benéficos gerados pelos probióticos são específicos para cada hospedeiro e que, frequentemente, cada biomolécula de interesse é sintetizada, em maior quantidade, por uma determinada linhagem bacteriana. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal a produção, purificação e identificação de potenciais bacteriocinas que tenham atividade antimicrobiana contra microrganismos responsáveis pela formação de cáries dentárias. Diferentes tipos de compostos antimicrobianos (*bacteriocin-like inhibitory substances* - BLIS) foram produzidos por *Lactiplantibacillus plantarum* ST16Pa, *Bifidobacterium lactis* BL 04, *Lactococcus lactis* CECT-4434 e *Lactobacillus lactis* 27 e sua ação antimicrobiana foi avaliada frente às linhagens de *Streptococcus mutans* UA159 e outras linhagens bioindicadoras. Os resultados obtidos mostraram que as BLIS produzidas pelas cepas *L. plantarum* ST16Pa e *L. lactis* CECT-4434 inibiram o crescimento de *S. mutans* UA159, enquanto a de *B. lactis* BL 04 apresentou o mais amplo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo todas as demais cepas.

Palavras-chave: cavidade oral; probióticos; bacteriocinas; *Streptococcus mutans*

ABSTRACT

SILVA, A. R. S. **Cultivo de bactérias ácido-láticas e determinação do potencial bacteriocinogênico no controle de patógenos bucais.** 2022. 55f. Tese (Doutorado em Tecnologia bioquímico farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The use of probiotic microorganisms in the prevention and treatment of human bacterial infections has been considered an efficient alternative to antibiotics. Additionally, recent studies demonstrate that specific biomolecules produced by these microorganisms, such as bacteriocins, vitamins, fatty acids, or exopolysaccharides, improve the immunity and development of their hosts. The most used probiotic microorganisms currently in the food and pharmaceutical industries are those belonging to the group of lactic acid bacteria (LABs) since they are considered safe by regulatory bodies in this area. The oral cavity is among the different places in the body that have the potential for applying probiotic lactic acid bacteria (LAB). Several clinical studies have shown a decrease in the prevalence of gingival inflammation (periodontitis) and oral candidiasis in adults who frequently use gums containing probiotic microorganisms. However, it is known that the beneficial effects generated by probiotics are specific to each host. Also, each biomolecule of interest is frequently synthesized in greater quantity by a specific bacterial strain. In this context, the main objective of this work is the production, purification, and identification of potential bacteriocins that have antimicrobial activity against microorganisms responsible for the formation of dental caries. In this work, different bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Lactiplantibacillus plantarum* ST16Pa, *Bifidobacterium lactis* BL 04, *Lactococcus lactis* CECT-4434, and *Lactobacillus lactis* 27. Furthermore, their antimicrobial action was evaluated against *Streptococcus mutans* UA159 and other bioindicator strains. The results showed that the BLIS produced by the strains *L. plantarum* ST16Pa and *L. lactis* CECT-4434 inhibited the growth of *S. mutans* UA159. At the same time, *B. lactis* BL 04 presented the broadest spectrum of antimicrobial activity, inhibiting all other strains.

Keywords: oral cavity; probiotics; bacteriocins; *Streptococcus mutans*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS	14
3	CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	Streptococcus mutans.....	15
3.2	Bactérias ácido-láticas.....	17
3.3	Bactérias ácido-láticas e doença periodontal	23
3.4	Bactérias ácido-láticas no controle do biofilme oral.....	25
4	CAPÍTULO 2 – ARTIGO PUBLICADO.....	27
1.	Introduction.....	27
2.	Materials and Methods	29
2.1.	Bacterial Strains.....	29
2.2.	Culture Conditions.....	29
2.3.	Co-cultures.....	29
2.4.	Kinetic Study of Lactic Acid Bacteria Growth	29
2.5.	Acidification Kinetics.....	30
2.6.	Determination of Antimicrobial Activity by the Critical Dilution Technique.....	30
2.7.	Determination of Antimicrobial Activity Against Cariogenic Microorganism	30
2.8.	Effect of Proteases, Solvents, Salts and Detergents on BLIS	30
2.9.	BLIS Concentration by Precipitation with Ammonium Sulfate.....	31
3.	Results and Discussion.....	31
3.1.	Antimicrobial Activity of BLIS by the Critical Dilution Technique.....	31
3.2.	Kinetics of Lactic Bacteria Growth in Monocultures	32
3.3.	Antimicrobial Activity Against Cariogenic Microorganism	32
3.4.	Preliminary Characterization of BLIS	35
3.5.	BLIS Production in Co-cultures	36
3.6.	BLIS Concentration and Partial Purification by Salting Out with Ammonium Sulfate.....	37
4.	Conclusions.....	37
	References.....	38
5	CONCLUSÃO.....	41
6	DISCIPLINAS, EVENTO E OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS.....	42
6.1	Considerações sobre a pandemia	42
6.2	Atividades Realizadas.....	42

7	REFERÊNCIAS	45
---	-------------------	----

1 INTRODUÇÃO

O conceito de saúde não leva em conta apenas a ausência de doenças, mas também pode ser definido como “completo bem-estar físico, mental e social” (Conferência de Ottawa/Canadá, 1986).

Os indicadores em saúde bucal são bem semelhantes aos de saúde brasileira no geral. A saúde bucal tem maior importância quando se fala em qualidade de vida da população, propondo a busca de mecanismos que ampliem o âmbito de suas ações e busquem melhorias no perfil epidemiológico (Carvalho 2004).

O Brasil é um dos países com os maiores índices de prevalência de doenças bucais, destacando-se a cárie dentária e a doença periodontal. O Índice de Ataque de Cárie, formulado em 1937 por Klein e Palmer, apresentado através das iniciais CPO, ainda é o mais utilizado para obtenção de dados epidemiológicos em saúde bucal (PINTO, 2008).

A saúde oral vai além de uma boa dentição, mas também de uma perfeita harmonia entre o complexo craniofacial, que abrange tecidos moles e duros bucais, da face e do crânio (BRASIL, 2004). O tratamento destina-se a todas as idades e a ampliação dos serviços odontológicos é feita basicamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2013).

A cavidade oral é um ecossistema dinâmico onde as interações das bactérias comensais limitam a colonização de microrganismos patogênicos. A microbiota oral é heterogênea e diversa, e seu desequilíbrio leva ao início das principais doenças bucais, entre elas a periodontite e cárie dentária (Willis e Gabaldon, 2020)

O tratamento convencional dessas doenças envolve a remoção da placa bacteriana por meios mecânicos e terapia com antimicrobianos que pode ter eficácia limitada devido à resistência aos medicamentos (Haque *et al.*, 2019).

O biofilme é uma estrutura tridimensional de comunidades microbianas aderidas a uma superfície sólida compostas por microrganismos da mesma ou de diferentes espécies, que formam uma matriz com polímeros extracelulares que apresentam características fenotípicas que a diferenciam da forma planctônica (Miller *et al.* 2013; Harriott, Noverr, 2011; Seneviratne *et al.*, 2008).). A formação de biofilme é um dos mecanismos específicos de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, o que resulta em infecções crônicas apesar do tratamento (Pelgrift *et al.* 2013). Sendo assim, prevenir a formação dos biofilmes é considerada a medida mais eficaz a ser assumida contra às infecções.

A matriz extracelular dos biofilmes microbianos mono e multiespécie é uma das principais características, pois não só ajudam na defesa contra as células fagocíticas, como também auxiliam na manutenção da integridade do biofilme e limitam a difusão de substâncias tóxicas (Blankenship, Mitchell, 2006).

Diversos estudos apontam que pelo menos 80% de todas as infecções humanas estão relacionadas com biofilmes microbianos (Harriott, Noverr, 2011) devido a alta resistência aos agentes antimicrobianos em comparação com os seus homólogos planctônicos (Ten Cate *et al.*, 2009; Thein *et al.*, 2009).

Na tentativa de descobrir um método de tratamento e prevenção eficiente em doenças orais, como a cárie, começou a ser estudado na Odontologia o uso de bactérias probióticas (Caufield *et al.*, 2015; Palombo, 2011). São microrganismos probióticos aqueles que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os efeitos potenciais de espécies probióticas sobre patógenos cariogênicos ou periodontais têm sido abundantemente demonstrados *in vitro* (Gruner *et al.*, 2016).

Os probióticos são capazes de produzir ácidos graxos, vitaminas (complexo B) e biomoléculas antimicrobianas, como bacteriocinas e ácidos orgânicos, estes microrganismos podem atuar de forma específica contra determinados patógenos, trazendo benefícios na modulação da atividade da microbiota intestinal, aprimoramento da resistência frente a bactérias patogênicas e melhoria da saúde e imunidade da mucosa intestinal (Chen, Liu e Hu 2019; Hill *et al.*, 2014; Kim *et al.* 2020; LeBlanc *et al.*, 2011; Saputra *et al.* 2016).

Apesar de algumas espécies de *Lactobacillus* terem sido estudadas e discutidas como participantes da progressão da cárie dentária, muitos estudos demonstraram que estas cepas, quando incorporadas em diferentes produtos comerciais, apresentaram efeitos inibitórios sobre microrganismos responsáveis pela doença de cárie (Matsumoto *et al.*, 2005; Caufield, *et al.*, 2015; Marttinen *et al.*, 2012). Em particular, alguns pesquisadores reportaram que a cepa probiótica *Streptococcus thermophilus* já apresentou atividade antibacteriana contra espécies orais como *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sobrinus* e *P. gingivalis* (Lee e Baek, 2014; Petti *et al.*, 2008). Essa atividade antimicrobiana pode ser devido à produção de BLIS e/ou bacteriocinas.

No entanto, sua atividade não deve competir com a microbiota autóctone, mas interagir de forma simbiótica. Outro critério fundamental para o uso de probióticos é assegurar que não causem danos à saúde de humanos ou animais. Neste âmbito, os microrganismos probióticos

mais usados nas indústrias de alimentos e farmacêuticas pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (BALs) (Kumariya et al. 2019).

As BALs têm ganhado destaque neste cenário pelo alto potencial de aplicação de suas bacteriocinas e a sua capacidade biopreservativa em alimentos (Sabo et al., 2017). Seu mecanismo de inibição de bactérias patogênicas é mediado, principalmente, pela produção das bacteriocinas, biomoléculas originárias da síntese proteica, que apresentam atividade antimicrobiana, além de estimular a produtividade animal, proporcionando o ganho de peso, fortalecendo o sistema imune e reduzindo a taxa de mortalidade mediante o controle de patógenos (Chen, Liu e Hu 2019; Diez-Gonzalez, 2007).

Existem muitas linhagens de BALs com as peculiaridades citadas, entretanto, é raro encontrar uma única cepa que desencadeie múltiplos efeitos (Chapman et al., 2011). Assim, a tendência do mercado atual é utilizar uma combinação de diferentes linhagens probióticas para maximizar os benefícios gerados ao hospedeiro. Ao mesmo tempo, existe grande preocupação quanto à estabilidade dos microrganismos probióticos, bem como de seus biocompostos, frente às condições adversas do trato gastrointestinal, tais como pH ácido, presença de sais biliares e estabilidade térmica (Cook et al., 2012).

As bacteriocinas são peptídeos sintetizados por bactérias que são excretadas ao meio extracelular apresentando atividade bactericida ou bacteriostática contra microrganismos da mesma espécie ou de outros gêneros (Balciunas *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2013ab). Diversas bactérias são produtoras de bacteriocinas, porém, aquelas produzidas por bactérias ácido-láticas têm ganhado destaque devido ao seu alto potencial de aplicação na área da saúde, além de serem consideradas biomoléculas seguras para a saúde humana (GRAS – *Generally Recognized As Safe*) (Jeevaratnam *et al.*, 2005).

O potencial terapêutico e profilático dos probióticos foi explorado com resultados promissores nas principais doenças bucais, como periodontite e cárie dentária (Seminário *et al.*, 2017; Sivamaruthi *et al.*, 2020). No entanto, permanecem dúvidas sobre as melhores espécies ou cepas de probióticos para cada doença oral (Veiga *et al.*, 2020), e assim como a dose e frequência de administração.

É no contexto de verificar a atividade antimicrobiana das bactérias ácido-láticas que este trabalho se torna relevante, pois abre caminho para a identificação de outras bactérias ácido-láticas que dificultem a progressão de doenças bucais, como a cárie e periodontite, podendo

assim contribuir para o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle do biofilme bucal e para a promoção da saúde na cavidade oral.

2 OBJETIVOS

- Verificar a viabilidade celular e atividade antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* ST16 Pa, *Pediococcus pentosaceus* ATCC 33316, *Lactococcus lactis* CECT-4434, *Bifidobacterium lactis* BL 04 *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, *Lactobacillus lactis* 27 e *Streptococcus thermophilus* TA040 contra a cepa cariogênica *Streptococcus mutans* UA156 e contra as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Carnobacterium maltaromaticum* CECT 4020, *Staphylococcus aureus* CECT 239 e *Listeria innocua* CLIST 2711;
- Verificar a produção de BLIS das cepas com ação antimicrobiana;
- Verificar o efeito das proteases sobre o BLIS;
- Purificar parcialmente com sulfato de amônio o BLIS das cepas com ação antimicrobiana.

3 CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Streptococcus mutans*

Os estreptococos constituem um gênero de bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas e são caracterizados pela morfologia que varia de dois a muitos cocos em cadeia ao exame microscópico (ZHOU; LI, 2015). Na bacteriologia clínica, os estreptococos são divididos em três categorias com base em sua capacidade de induzir hemólise: α -hemolítico, β -hemolítico e γ -hemolítico (ou não hemolítico) (ZHOU; LI, 2015). Os grupos de estreptococos *viridans* incluem várias espécies de estreptococos α -hemolíticos e γ -hemolíticos sendo que a maioria faz parte da microbiota normal do trato respiratório superior e geniturinário (PROCOP *et al.*, 2017).

Os grupos de estreptococos *viridans* incluem o grupo mutans, o mitis/sanguinis, o salivarius, o anginosus e o bovis (DOERN; BURNHAM, 2010). Os microrganismos podem ser classificados nesses grupos com base na produção de arginina di-hidrolase (ADH), hidrólise da esculina (ESC), produção de acetoina na prova de Voges-Proskauer (VP), produção de ácidos a partir da fermentação de manitol (MNTL) e sorbitol (SORB) e produção de urease (URE)

A cavidade oral abriga mais de 700 espécies de bactérias que colonizam as superfícies dos dentes e os tecidos moles da mucosa oral (KILIAN *et al.*, 2016). Neste contexto, *Streptococcus mutans*, uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa e fermentadora de açúcares, é um microrganismo amplamente associado à cárie dentária (LOESCHE, 1986; PITTS *et al.*, 2017) As cepas de *S. mutans* são classificadas em quatro sorotipos clínicos: *c*, *e*, *f* e *k* e essa classificação é baseada na estrutura química do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular bacteriana, com aproximadamente 75-80% das cepas encontradas na cavidade oral classificadas como sorotipo *c*, seguido pelos *e* (20%), *f* (5%) e *k* (2-5%) (LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009; NAKANO; OOSHIMA, 2009).

A partir da metabolização dos açúcares da dieta, como a sacarose, *S. mutans* consegue sintetizar polissacarídeos extracelulares e intracelulares, como glucanos insolúveis e solúveis (MARSH, 2006; BOWEN; KOO, 2011). Os glucanos insolúveis são sintetizados pela ação das glucosiltransferases (Gtfs), que possuem papel importante na adesão de microrganismos ao esmalte dentário para o estabelecimento de um biofilme cariogênico que restringe a saída de ácidos orgânicos e a entrada de saliva para o tamponamento do pH do fluido do biofilme na interface dente-biofilme, criando microambientes ácidos que são essenciais para a patogênese

da cárie dentária (BOWEN; KOO, 2011; KLEIN *et al.*, 2015). A dissolução dos minerais dentários é promovida pelo aprisionamento dos ácidos orgânicos no biofilme cariogênico, principalmente o cálcio e o fosfato do cristal de hidroxiapatita do esmalte dentário, que resulta na desmineralização e conseqüentemente, formação de lesões de cárie (MARSH, 2006; PITTS *et al.*, 2017).

A cárie dentária é uma doença dependente do acúmulo de um biofilme complexo na superfície do dente, frequente exposição aos carboidratos fermentáveis da dieta, principalmente a sacarose, e para finalizar, uma higiene bucal deficiente (FEJERSKOV, 2004; PITTS *et al.*, 2017). O biofilme dentário é formado pela associação de microrganismos que estão aderidos às superfícies dentárias e protegidos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (FLEMMING *et al.*, 2016; BOWEN *et al.*, 2018). Embora a prevalência global padronizada por idade e a incidência de cárie não tratada em dentes permanentes tenham permanecido estáveis ao longo dos últimos anos (1990 - 2015), dados do estudo de Carga Global de Doenças (GBD, 2015) mostraram que a cárie foi a condição mais prevalente (34,1%) em todo o mundo afetando 2,5 bilhões de pessoas (KASSEBAUM *et al.*, 2017).

O microrganismo *S. mutans* foi descrito pela primeira vez no início do século XX pelo pesquisador James Kilian Clarke que o isolou de lesões de cárie (CLARKE, 1924). Mas foi somente na década de 1960 que o *S. mutans* começou a ser mais estudado e foi reconhecido como um microrganismo cariogênico (LOESCHE, 1986).

S. mutans possui características de virulência que incluem: (i) a capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogenicidade) a partir da metabolização de carboidratos; (ii) a capacidade de sobreviver em pH baixo (aciduricidade) e (iii) a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares e intracelulares a partir da metabolização dos açúcares da dieta. Essas características de virulência são fundamentais na adesão inicial, colonização e acúmulo de biofilmes cariogênicos nas superfícies dentárias (MARSH, 2006; BOWEN; KOO, 2011).

A perda da estrutura mineral do dente, especialmente o cálcio e o fosfato do cristal da hidroxiapatita, ocorre quando o pH do fluido em contato com a dentina e o esmalte encontra-se abaixo de 6,5 e 5,5, respectivamente (desmineralização) (CURY *et al.*, 2016). Após 20-30 minutos da ingestão, os açúcares são eliminados da boca por deglutição e diluição salivar resultando no retorno do pH do fluido à neutralidade, quando, acima de 5,5 para o esmalte e 6,5 para dentina, os minerais perdidos são parciais ou totalmente recuperados pela ação

remineralizante da saliva (remineralização) (CURY *et al.*, 2016). O equilíbrio em direção à desmineralização ou remineralização dependerá, portanto, da frequência de ingestão diária de açúcar (CURY *et al.*, 2016). Contudo caso ocorra um desequilíbrio favorável à desmineralização, a perda de minerais acentua-se podendo resultar na formação de lesões de cárie em esmalte e dentina (PITTS *et al.*, 2017). Neste contexto, a remoção mecânica do biofilme, a restrição à ingestão de açúcares e a adoção de terapias com fluoreto são primordiais para a manutenção da higidez dos dentes (CURY *et al.*, 2016).

3.2 *Bactérias ácido-láticas*

As bactérias ácido-láticas despertam interesse industrial devido a produção de ácido láctico e além de que muitas espécies possuem a capacidade de produzir biopolímeros de diferentes estruturas, e com diferentes aplicações (Laws *et al.*, 2001).

As primeiras definições de bactérias lácticas estavam relacionadas à capacidade de fermentar o leite, e por isso, estavam inseridos os *Lactobacillus* e até a *Escherichia coli* dentro deste grupo de bactérias. Hoje, se sabe que algumas bactérias lácticas não fermentam a lactose (Ferreira, 2003).

O Manual Bergey's (Holt *et al.*, 1989), define bactérias lácticas como sendo bactérias Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa, desprovidas de citocromos, crescimento em condições de aerobiose, microaerofilia ou anaerobiose facultativa, com temperatura variando entre 35 o C a 40 o C. Estudos posteriores acrescentaram outras características como a morfologia cocos ou bacilos, baixo teor de guanina + citosina (G-C), ácido tolerantes, não pigmentadas, não reduzem o nitrato, não liquefazem a gelatina e nem produzem sulfeto de hidrogênio (Salminen, Wright, e Ouwehand, 2004).

Algumas bactérias lácticas também fazem parte da microbiota normal do corpo animal, ocorrendo em número considerável na nosofaringe, trato intestinal e geniturinário. Normalmente, também não são patogênicas, exceto no gênero *Streptococcus* no qual podem ser encontrada algumas espécies com potencial de causar doenças no hospedeiro (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

A maioria dos microrganismos identificados até o momento com propriedades probióticas são bactérias Gram-positivas que pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* e *Bifidobacterium* (Porto *et al.*, 2017). Este grupo de microrganismos apresenta dois principais mecanismos de ação: um relacionado à interferência na colonização bacteriana

das superfícies da cavidade oral e outro relacionado à modulação da resposta do hospedeiro frente às bactérias cariogênicas (Chatterjee *et al.*, 2011). Em geral, bactérias ácido-láticas podem produzir compostos antimicrobianos, tais como, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que são capazes de inibir o crescimento de bactérias deteriorantes e patogênicas (Reis *et al.*, 2012; Ünlü *et al.*, 2015). Substâncias inibidoras semelhantes às bacteriocinas (BLIS) são bacteriocinas que não são obtidas na forma pura ou totalmente caracterizadas em termos de suas sequências de aminoácidos e peso molecular (Cavera *et al.*, 2015; Jawan *et al.*, 2021; Sidek *et al.*, 2018). Bacteriocinas e BLIS são peptídeos ou proteínas produzidos pelos ribossomos e secretados no ambiente extracelular.

Apesar de algumas espécies de *Lactobacillus* terem sido estudadas e discutidas como participantes da progressão da cárie dentária, muitos estudos demonstraram que estas cepas, quando incorporadas em diferentes produtos comerciais, apresentaram efeitos inibitórios sobre microrganismos responsáveis pela doença de cárie (Matsumoto *et al.*, 2005; Caufield, *et al.*, 2015; Marttinen *et al.*, 2012). Em particular, alguns pesquisadores reportaram que a cepa probiótica *Streptococcus thermophilus* já apresentou atividade antibacteriana contra espécies orais como *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sobrinus* e *P. gingivalis* (Lee e Baek, 2014; Petti *et al.*, 2008). Essa atividade antimicrobiana pode estar relacionada à produção de BLIS e/ou bacteriocinas.

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados por bactérias e que são excretadas ao meio extracelular que apresentam atividade bacteriostática ou bactericida contra microrganismos de outros gêneros ou da mesma espécie (Balciunas *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2013ab). Existem diversas bactérias produtoras de bacteriocinas, porém, aquelas que são produzidas por bactérias ácido-láticas têm ganhado destaque devido ao seu alto potencial de aplicação na área da saúde, além de serem consideradas biomoléculas seguras para a saúde humana (GRAS – *Generally Recognized As Safe*) (Jeevaratnam *et al.*, 2005).

A produção da bacteriocinas por *Lactobacillus acidophilus* foi descrita pela primeira vez por Barefoot e Klaenhammer (1984) e denominada lactacina B. Posteriormente, estudos feitos revelaram algumas regiões responsáveis pela produção de lactacina, através de uma análise da sequência genômica da linhagem *L. acidophilus* NCFM (Altermann *et al.* (2004). Alguns pesquisadores reportaram que a maioria das bacteriocinas produzidas por *L. acidophilus* são peptídeos estáveis ao calor, de baixa massa molar e não-lantibióticos, pertencentes às bacteriocinas de classe II, como as pediocinas (Bogovic-Matijasić *et al.*, 1998; Chumchalová *et al.*, 2004).

De uma forma geral, as bacteriocinas produzidas por *L. acidophilus* têm um espectro inibitório muito estreito, como observado com a lactacina B produzida por *L. acidophilus* NCFM (Barefoot e Klaenhammer, 1984), sendo homóloga à acidocina CH5 e acidocina J1132 (Chumchalová *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 1996). Para que haja aumento da produção de bacteriocinas de *L. acidophilus* é necessária a otimização de fatores ambientais, como o pH, temperatura e composição do meio de cultura (Barefoot e Klaenhammer, 1984; Bogovic-Matijasić *et al.*, 1998; Chumchalová *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 1996).

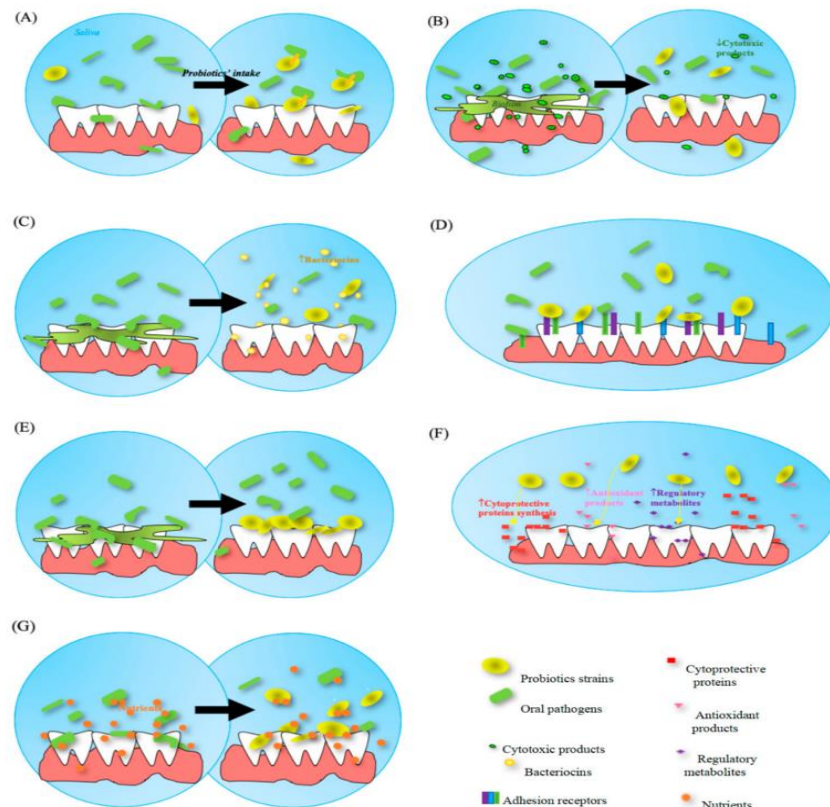
Cotter e colaboradores (2005), dividiram as bacteriocinas em categorias distintas: as bacteriocinas que contenham lantionina, que são conhecidos como Lantibióticos (Classe I); as bacteriocinas que não possuem lantionina em sua estrutura (Classe II); e as que contêm hidrolases de mureína (Classe III) conhecidos como bacteriolisinas. As bacteriocinas da classe II possuem baixo peso molecular ficando abaixo de 10 kDa e são divididas em quatro sub-classes: IIa que são bacteriocinas que possuem um peptídeo e ação anti-listérica; IIb que são formadas por dois peptídeos diferentes; IIc consiste em bacteriocinas cíclicas; e IId sendo constituídas por bacteriocinas que não se assemelham a pediocina, mas que possuem um peptídeo. (Messaoudi *et al.*, 2013).

A geração de peptídeos e proteínas sintéticos ou de origem microbiana representa uma nova via de translação para a manutenção da homeostase oral, modulação de biofilmes orais e, consequentemente, prevenção de doenças.

Geralmente as bacteriocinas ou BLIs produzidas por BALs são as mais estudadas, pois são consideradas GRAS (*Generally Recognized As Safe*), assim espera-se que os compostos antimicrobianos produzidos pelas mesmas sejam seguros para o uso (Woraprayote, 2016).

O potencial terapêutico e profilático dos probióticos foi explorado com resultados promissores nas principais doenças bucais (Figura 1), como periodontite e cárie dentária (Seminário *et al.*, 2017; Sivamaruthi *et al.*, 2020). No entanto, permanecem dúvidas sobre as melhores espécies ou cepas de probióticos para cada doença oral (Veiga *et al.*, 2020), e assim como a dose e frequência de administração.

Figura 1 – Potenciais mecanismos de ação dos probióticos na saúde bucal: (A) interação direta com patógenos para prevenir a colonização de patógenos; (B) atividade antagônica em metabólitos citotóxicos de patógenos, biofilme oral e matriz extracelular; (C) síntese de agentes antibacterianos (por exemplo, bacteriocinas) contra patógenos orais; (D) alterar adesão, agregação, colonização e proliferação de patógenos em tecidos orais devido a mecanismos de exclusão e competição; (E) revestimento dos tecidos orais para proteger as superfícies da ação de patógenos; (F) manter o equilíbrio do ecossistema oral por meio da síntese de proteínas, produtos antioxidantes e metabólitos reguladores na superfície das células orais; (G) competição por nutrientes



Fonte: Adaptado de Saiz *et al.*, 2021.

L. acidophilus La-5 é uma bactéria probiótica amplamente conhecida em produtos lácteos fermentados (Shah, 2000; Tabasco *et al.*, 2007) que demonstrou benefícios na capacidade de colonização e competição no trato gastrointestinal (Jain *et al.*, 2004; Wenus *et al.*, 2008). Tabasco *et al.* (2009) reportaram que a cepa *L. acidophilus* aumentou a produção de lactacina B quando cultivada em co-cultura com *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, espécie utilizada como cultura inicial para fabricação de iogurte (Figura 2).

Figura 2 – Cultivo de Bactérias ácido-láticas em *shaker*



Fonte: O autor.

S. thermophilus e *L. bulgaricus* interagem de forma mútua e favorável onde cada uma dessas bactérias produz um ou mais metabólitos que estimulam o crescimento do outro (Oliveira et al., 2012a). O fenômeno da simbiose foi estudado por vários autores, que observaram um efeito positivo da co-cultura em relação às monoculturas em termos de proteólise, crescimento celular, acidificação, produção de diacetil e acetoína, exopolissacarídeos e bacteriocinas (Béal et al., 1994; Oliveira et al., 2011ab, 2012abc; Tabasco et al., 2009).

Estudos realizados sobre os fatores que estimulam cada uma dessas bactérias, mostraram que o ácido fórmico e o CO₂ produzidos *Streptococcus thermophilus* estimulam *L. bulgaricus*. Já *Streptococcus thermophilus*, é estimulado pelos aminoácidos e pequenos peptídeos da atividade metabólica do *L. bulgaricus* (Oliveira et al., 2012a). O CO₂ é igualmente um fator estimulante para *L. bulgaricus*, pois provém da descarboxilação da uréia pela enzima urease excretada por *S. thermophilus*.

A maioria dos microrganismos identificados até o momento com propriedades probióticas são bactérias Gram-positivas que pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* e *Bifidobacterium* (Porto et al., 2017). Este grupo de microrganismos apresenta

dois principais mecanismos de ação: um relacionado à interferência na colonização bacteriana das superfícies da cavidade oral e outro relacionado à modulação da resposta do hospedeiro frente às bactérias cariogênicas (Chatterjee et al., 2011). Em geral, as bactérias probióticas apresentam sistemas de autodefesa, tais como o ácido lático produzido por algumas espécies de lactobacilos, as substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (BLIS - *bacteriocin-like inhibitory substance*) e peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) (Cavera et al., 2015).

Apesar de algumas espécies de *Lactobacillus* terem sido estudadas e discutidas como participantes da progressão da cárie dentária, muitos estudos demonstraram que estas cepas, quando incorporadas em diferentes produtos comerciais, apresentaram efeitos inibitórios sobre microrganismos responsáveis pela doença de cárie (Matsumoto et al., 2005; Caufield, et al., 2015; Marttinen et al., 2012; Schwendicke et al., 2014). Em particular, alguns pesquisadores reportaram que a cepa probiótica *Streptococcus thermophilus* já apresentou atividade antibacteriana contra espécies orais como *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sobrinuse* e *P.gingivalis* (Lee e Baek, 2014; Petti et al., 2008). Essa atividade antimicrobiana pode ser devido à produção de BLIS e/ou bacteriocinas.

A produção da bacteriocinas por *Lactobacillus acidophilus* foi descrita pela primeira vez por Barefoot e Klaenhammer (1984) e denominada lactacina B. Posteriormente, Altermann et al. (2004) revelaram algumas regiões responsáveis pela produção de lactacina, através de uma análise da sequência genômica da linhagem *L. acidophilus* NCFM. Alguns pesquisadores reportaram que a maioria das bacteriocinas produzidas por *L. acidophilus* são peptídeos estáveis ao calor, de baixa massa molar e não-lantibióticos, pertencentes às bacteriocinas de classe II, como as pediocinas (Bogovic-Matijasić et al., 1998; Chumchalová et al., 2004).

De uma forma geral, as bacteriocinas produzidas por *L. acidophilus* têm um espectro inibitório muito estreito, como observado com a lactacina B produzida por *L. acidophilus* NCFM (Barefoot e Klaenhammer, 1984), sendo homóloga à acidocina CH5 e acidocina J1132 (Chumchalová et al., 2004; Tahara et al., 1996). Para que haja aumento da produção de bacteriocinas de *L. acidophilus* é necessária a otimização de fatores ambientais, como o pH, temperatura e composição do meio de cultura (Barefoot e Klaenhammer, 1984; Bogovic-Matijasić et al., 1998; Chumchalová et al., 2004; Tahara et al., 1996).

3.3 Bactérias ácido-láticas e doença periodontal

O conhecimento sobre microrganismos patogênicos é importante para o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção de doenças. Diversos estudos já mostraram que possivelmente existe uma similaridade entre as bactérias periodontais em indivíduos da mesma família (Tuite-McDonnell *et al.*, 1997).

Porphyromonas gingivalis pertence ao gênero *Porphyromonas* e possui fatores de virulência essenciais para as interações com o hospedeiro, como por exemplo, a capacidade de aderir a uma variedade de células e tecidos, assim como de multiplicar-se. A adesão à cavidade oral acontece através das fimbrias, proteases, hemaglutininas e lipopolissacarídeos (Goulbourne; Ellen, 1991). Fimbrias são longas e finas estruturas que se estendem a partir da membrana externa e que são capazes de aderir a uma variedade de componentes do hospedeiro, tais como, macromoléculas de saliva, células epiteliais, fibroblastos, e matriz extra-celular (Holt e Ebersole, 2005).

A doença peri-implantar e a doença periodontal possuem etiologias semelhantes, no entanto, há uma maior suscetibilidade à infecção por parte dos implantes (Belibasakis e Manoil, 2021). São diversos os fatores que contribuem para a formação do biofilme nos implantes, entre eles está a rugosidade da superfície do material, a má higienização do implante, o desenho da prótese e a microbiota oral (Schmid *et al.*, 2021)

Na cavidade oral, o implante é revestido por diversas camadas começando pela película adquirida. Diversas são as bactérias que vão se aderir ao implante, formando assim, um biofilme. Entre os colonizadores iniciais do implante estão principalmente *Actinomyces sp.* e *Streptococcus sp.* Os microrganismos presentes no implante começam a se co-agregar, levando assim, à formação da placa bacteriana, predominantemente colonizada por *P. gingivalis* (Schmid *et al.*, 2021).

Na tentativa de descobrir um método de tratamento e prevenção eficiente em doenças orais, tais como cárie, gengivite e até mesmo a periodontite, que estão associadas a uma mudança na composição e atividade do biofilme bacteriano, bem como a reações subsequentes do hospedeiro, começou a ser estudado na Odontologia o uso de bactérias probióticas (Caufield *et al.*, 2015; Palombo, 2011) que por definição, são microrganismos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os efeitos potenciais de espécies probióticas sobre patógenos cariogênicos ou periodontais têm sido abundantemente demonstrados *in vitro* (Gruner *et al.*, 2016).

A periodontite é uma doença inflamatória ocasionada pela disbiose de uma comunidade microbiana e não por patógenos selecionados (Hajishengallis e Lamont, 2014) que acomete os tecidos de suporte e de sustentação (gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar). De acordo com Armitage (1999), a periodontite está dividida em periodontite crônica onde há uma destruição lenta e contínua dos tecidos periodontais (Darveau, 2010; Kolenbrander et al., 2010), e periodontite agressiva onde há a destruição do ligamento periodontal e osso alveolar além de ser mais rápida e grave Nibali et al., 2013).

Porphyromonas gingivalis, uma bactéria anaeróbica Gram-negativa considerada o agente patogênico "pedra angular" da periodontite crônica (Pihlstrom et al., 2005). *Porphyromonas gingivalis* possui diversos fatores de virulência tais como proteínas da cápsula, lipopolissacarídeo (LPS), fímbrias e proteínas da membrana externa que podem determinar uma grande imunogenicidade, ao estimular mecanismo da imunidade inata e adaptativa, tanto na resposta imune humoral quanto na resposta imune celular do hospedeiro. As fímbrias (FimA e Mfa1) possuem ainda um papel importante na progressão da periodontite (Zenobia e Hajishengallis, 2015).

Na tentativa de descobrir um método de prevenção e tratamento eficientes em doenças orais, como cárie e a periodontite, começou a ser estudado na Odontologia o uso de bactérias probióticas (Caufield et al., 2015; Palombo, 2011) que por definição, são microrganismos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Os efeitos potenciais de espécies probióticas sobre patógenos cariogênicos ou periodontais têm sido abundantemente demonstrados *in vitro* (Gruner et al., 2016).

Estudos recentes revelaram que entre muitas cepas de lactobacilos e bifidobactérias avaliadas, o meio condicionado por *L. acidophilus* La-5 foi o único capaz de reduzir a formação de biofilme por *P. gingivalis* (Ishikawa et al., 2018). Neste estudo, os produtos excretados pela cepa probiótica foram capazes de alterar a expressão de genes associados à virulência das cepas *P. gingivalis* ATCC 33277 e W83, sendo de particular importância a redução na expressão de *fimA* e de *mfaI*. *FimA* codifica a fimbria principal, que promove a autoagregação do patógeno e ligação com células epiteliais (Lamont and Jenkinson 1998), e *mfaI* codifica a fimbria secundária, associada a agregação com estreptococos (Park e Simionato et al., 2005).

Ademais, *L. acidophilus* La5 também foi capaz de alterar a interação de *P. gingivalis* com células epiteliais gengivais (Albuquerque-Souza et al., 2018). A co-infecção de células epiteliais gengivais (GECs) OBA-09 com *L. acidophilus* La5 e *P. gingivalis* resultou em

redução da adesão e invasão do patógeno às GECs associadas à redução da síntese de TNF- α e IL-1 β , e regulação negativa de TLR4, mas não de TLR2, enquanto a produção de CXCL-8 aumentou com adição desta cepa probiótica. Além disso, o probiótico preveniu a morte celular causada pelo desafio com o patógeno periodontal. Outras cepas probióticas testadas também foram capazes de atenuar os efeitos do desafio com *P. gingivalis* nas GECs, mas *L acidophilus* LA5 foi o mais efetivo frente a duas cepas de *P. gingival*.

3.4 Bactérias ácido-láticas no controle do biofilme oral

A cavidade oral é composta por uma infinidade de bactérias que se organizam formando o biofilme. Algumas dessas bactérias são responsáveis por doenças bucais como a cárie e a periodontite (Aas et al., 2015). A formação do biofilme confere benefícios aos microrganismos, como a proteção contra a ação dos antimicrobianos (Holz et al., 2013; Elavarasu et al., 2016).

Apesar de existirem métodos para o controle do biofilme dentário, como a escovação e antibioticoterapia, os mesmos não apresentam resultados clínicos tão satisfatórios (Cogulu et al., 2010; Teughels et al., 2013). Sendo assim, necessário o desenvolvimento de terapias alternativas que sejam mais eficazes. A utilização de bactérias ácido láticas é uma das alternativas mais pesquisadas atualmente pois apresentaram bons resultados (Cogulu et al., 2010; Teughels et al., 2013; Mendi et al., 2016).

As bactérias probióticas ácido láticas, possuem características relevantes, e podemos destacar a sua capacidade de produzir bacteriocinas, que são capazes de permeabilizar a membrana externa das bactérias Gram-negativas e com isso, impedem a proliferação de bactérias cariogênicas (Elavarasu et al., 2016; Schwendicke et al., 2014; Ling-Ju et al., 2012)

As bactérias ácido láticas possuem ainda potencial arginolítico que metaboliza as enzimas arginina deiminase presentes nas bacteriocinas, gerando a amônia, que é responsável por neutralizar os ácidos do biofilme. Esse processo aumenta o pH da saliva, e dessa forma, previne a desmineralização dos dentes (Jalasvuori et al., 2012).

Algumas espécies bacterianas do biofilme subgingival apresentam importância no início e na progressão da doença periodontal. Dentro dessas diversas bactérias, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythensis* demonstram maior associação com as doenças periodontais. *Porphyromonas gingivalis*, é uma bactéria gram-negativa anaeróbia considerada importante agente etiológico na progressão e agravamento da periodontite crônica (Dizink et al., 1988).

Socransky *et al.* (1998) dividiu os microrganismos presentes na placa bacteriana em seis grupos. Grupo vermelho é basicamente formado por *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*.

Grupo Laranja é formado por *Streptococcus constellatus*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum vincentii/nucleatum/polymorphum*, *Fusobacterium periodonticum*; Grupo Verde é formado por *Capnocytophaga gingivalis/sputigena/ochracea/conciscus*, e, *Actinobacillus actinomycetemcomitans a*; No grupo amarelo, encontramos *Streptococcus mitis /oralis/ sanguinis/ gordoni/ intermedius /mutans*;

Já o grupo roxo é formado por *Villonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*; E por último o grupo azul formado por *Actinobacillus actinomycetemcomitans b*, *Actinomyces naeslundii/viscosus*, *Selenomonas noxia*.



Article

Cultivation of Lactic Acid Bacteria and Evaluation of the Antimicrobial Potential of Partially Purified Bacteriocin-like Inhibitory Substances Against Cariogenic and Food Pathogens

Amanda Romana Santos da Silva ¹, Pamela Oliveira de Souza de Azevedo ¹, Attilio Converti ^{2,*} and Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira ¹

¹ Department of Biochemical-Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl 16, São Paulo 05508-900, Brazil; amandaromana@usp.br (A.R.S.d.S.); pam.o.souza@usp.br (P.O.d.S.d.A.); rpsolive@usp.br (R.P.d.S.O.)

² Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, University of Genoa, Pole of Chemical Engineering, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy;

* Correspondence: converti@unige.it; Tel.: +39-010-3352593

Abstract: One of the major challenges in the pharmaceutical industry is the search for new antimicrobial compounds that can replace antibiotics. Lactic acid bacteria (LAB) can produce bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) that have a bacteriostatic or bactericidal effect against different bacterial genera, including those responsible for dental caries. Among the pathological processes of microbial etiology, the dental caries stands out, whose main pathogenic agent is the species *Streptococcus mutans*, present in about 80–90% of the oral cavity. In this context, this study aimed to produce and semi-purify BLIS from *Lactobacillus plantarum* ST16 Pa, *Bifidobacterium lactis* BL 04, *Lactococcus lactis* CECT-4434 and *Lactobacillus lactis* 27 as well as to assess their antimicrobial potential against important dental caries causing pathogens like *S. mutans* UA159, *Listeria innocua* 2711, *Carnobacterium maltaromaticum* CECT 4020, *Staphylococcus aureus* CECT 239, and *Escherichia coli* ATCC 25922. While BLIS from *L. plantarum* ST16 Pa and *L. lactis* CECT-4434 were able to inhibit the growth only of *S. mutans* UA159, that which was produced by *B. lactis* BL 04 did so against all bioindicator strains; therefore, this suggests that its application could be important in the control of cariogenic microorganisms.

Keywords: bacteriocins; lactic acid bacteria; purification; caries; control of pathogens; antimicrobial activity; food



Citation: Silva, A.R.S.; Azevedo, P.O.S.; Converti, A.; Oliveira, R.P.S. Cultivation of lactic acid bacteria and evaluation of the antimicrobial potential of partially purified bacteriocin-like inhibitory substances against cariogenic and food pathogens. *2022*, *8*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Chih Yao Hou

Received: 28 July 2022

Accepted: 15 August 2022

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The human oral cavity is inhabited by hundreds of bacterial species that relate to each other and the host in a complex way, such as through competitive, cooperative, and parasitic relations, which can lead to oral diseases [1,2]. Oral diseases are one of the world's main problems that affect child and youth populations. The Global Burden of Disease estimated that oral diseases affect about 3.5 billion people worldwide, the most common being dental caries. Globally, it is estimated that 2.3 billion people suffer from caries in permanent teeth and more than 530 million children suffer from caries in deciduous teeth [3].

Streptococcus mutans is considered the main agent of caries, as it has peculiar properties such as the ability to colonize the dental surface through the adhesion and production of extracellular polysaccharides, which enables the formation of a thick biofilm. In addition, it has the ability to survive in acidic mediums and accumulate intracellular polysaccharides from the fermentation of glucose and other carbohydrates [4]. A carious injury begins with the establishment of a specific bacterial population, which is able to demineralize the enamel under a specifically modified environment in the oral cavity [5]. Different changes appear in the oral ecosystem leading to the proliferation of bacterial biofilm, composed especially by *S. mutans* cells.

Another important microorganism is *Staphylococcus aureus*, which can be found in the larynx, oral and nasal cavity, or in contaminated foods [6]. *S. aureus* is also the main vector of bacterial endocarditis because, using dental caries as a gateway to the blood system, it can reach the heart and produce a series of toxins, which can give children more risk and even be fatal [7].

The oral cavity is a dynamic ecosystem with permanent characteristics and a peculiar heterogeneous microbiota, whose imbalance leads to the beginning of major oral diseases such as periodontitis and dental caries [8]. Conventional treatment of these diseases involves the removal of bacterial plaque by mechanical means and therapy with antimicrobial drugs that may have limited efficacy due to resistance of microorganisms to antibiotics [9]. According to the World Health Organization (WHO) and the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), probiotics are “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” [10]. Traditionally, the main area of study of probiotics concerns the gastrointestinal tract, with the objective of preventing and/or treating diseases. Even though probiotics are widely used for the treatment of intestinal diseases, they have not yet been applied to treat oral diseases due to the scarcity of dental studies. Studies have already shown that some probiotics can increase the proportion of beneficial bacteria in the mouth, contributing to the prevention and therapy of oral diseases [11–13]. To be effective in the limitation or prevention of dental caries, probiotics must a) adhere to and colonize dental surfaces by integrating themselves into the bacterial community constituting dental biofilm; b) compete with cariogenic and pathogenic bacteria, antagonizing them, and inhibiting and/or delaying their proliferation; c) metabolize sugars with low acid production to minimize tooth enamel erosion; d) hinder the organization of extracellular matrix responsible for biofilm formation; e) limit the production of cytotoxic products by pathogenic bacteria; and e) beneficially alter the parameters influencing tooth plate formation (e.g., salivary components, buffering power, etc.) [11–15].

During the last decade, several researchers have demonstrated the beneficial use of probiotics in the oral cavity. For instance, bacteria belonging to the genus *Bifidobacterium* showed encouraging results in the control of ligature-induced periodontitis in mice by modulating the host response [16]. In humans, the ingestion of *B. animalis* subsp. *lactis* led to decreased IL-1 β levels in the gingival crevicular fluid [17] and was successfully used as a complement to mechanical treatment of periodontitis [18]. Some *Lactobacillus* strains exhibited potential for dental caries prevention, mainly due to their possible inhibitor activity against cariogenic streptococci and the fact that they are considered safe for oral administration in humans [8].

Bacteriocins are low molecular weight peptides that have inhibitory activity against bacteria, protozoa, fungi, and viruses. Although bacteriocins are produced by several microorganisms, those produced by lactic acid bacteria (LABs) have been receiving greater attention because this group of bacteria is generally safe for human consumption [19,20]. The antimicrobial activity of bacteriocins varies according to the bacteria that produce them and the environment in which they grow, and may have a bacteriostatic or bactericidal effect. Although bacteriocins produced by probiotics are generally recognized as safe (GRAS), nisin is the only approved for use as a food preservative, whose activity analysis parameters, concentration in each type of food, and issues related to safety and commercial use by the food industry are very well defined by WHO/FAO [21].

The relevance of this work is justified in the high rates of caries on a world scale and the therapeutic potential of probiotics that showed promising results in major oral diseases such as periodontitis and dental caries [22,23]. However, doubts still remain about the best probiotic strains for each oral disease [24], as well as their dosage and frequency of administration. Studies dealing with the prevention of oral pathologies are mostly directed to diet control, salivation stimuli, mechanical removal of dental plaque, and remineralization of non-cavitated surfaces in which the process has already begun. Therefore, it is ignored by the main oral health promotion programs one of the most important characteristics of oral microbiota—that is, the relationships among the different bacterial communities, especially the competitive ones [1].

In the context of the search for effective bacteriocins against cariogenic and food pathogens, the aim of this study was the identification of bacteriocin-producing LABs with the potential to contribute to the development of alternative methods for the control of oral biofilm and health promotion in the oral cavity.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains

Different species of bacteriocin-producing LABs were used in this study, namely *Lactobacillus plantarum* ST16 Pa, *Pediococcus pentosaceus* ATCC 33316, *Lactococcus lactis* CECT-4434, *Bifidobacterium lactis* BL 04 (Danisco, Sassenage, France), *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, and *Lactobacillus lactis* 27 (S.T. Dupont, Paris, France), while *Streptococcus thermophilus* TA040 (S.T. Dupont, Paris, France) was used as a control.

As for the bioindicator strains, *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC 700610) and *Escherichia coli* ATCC 25922 were purchased from the American Type Culture Collection, *Carnobacterium maltaromaticum* CECT 4020 and *Staphylococcus aureus* CECT 239 from Spanish Type Culture Collection (CECT), while *Listeria innocua* CLIST 2711 was kindly provided by the Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

2.2. Culture Conditions

P. pentosaceus ATCC 33316, *L. plantarum* ST16 Pa, *L. lactis* CECT-4434, *B. lactis* BL 04, *L. sakei* 2a, and *L. lactis* 27 were grown anaerobically in De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at 30 °C and pH 6.5 ± 0.2 for 16 h under 150 rpm orbital agitation (TE-424, Technical, Piracicaba, SP, Brazil). For a purity check, cells from each culture were seeded in Petri plates containing MRS medium plus 2% agar and incubated overnight at 37 °C.

All bioindicator strains (1.0 mL), previously cryopreserved at -70 °C in the presence of 20% glycerol (w/v), were aerobically reactivated in 5.0 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at 37 °C for 16 h without agitation. For purity check, cells from each culture were seeded in Petri plates containing TSB plus 2% agar and incubated overnight at 37 °C.

2.3. Co-cultures

To detect possible synergistic effects, bacteriocin-producing strains (1.0 mL) were cultivated in co-cultures with each other and/or with *S. thermophilus* TA040 in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of MRS broth supplemented with 1% (w/v) L-cysteine and 0.04% (w/v) sodium thioglyolate (Difco).

2.4. Kinetic Study of Lactic Acid Bacteria Growth

The growth kinetics of LABs (*L. plantarum* 16 PA, *L. lactis* CECT4434, *B. lactis* BL04, and *L. lactis* 27) was investigated along 52 h cultures using the pour plate methodology. For this purpose, the initial concentration of each LAB was adjusted to an optical density at 600 nm (OD_{600 nm}) of 0.8–0.9, which corresponded to 10⁷–10⁸ colony forming units (CFU) per mL. LABs were grown in sterile tubes containing 50 mL of MRS broth (Difco) at 37 °C,

from which 100 µL samples were collected every 2 h. Afterwards, serial dilution (1:10) was performed using sterile distilled water, and all dilutions were seeded on the surface of 1% (w/v) MRS agar in triplicate. After plate incubation at 37 °C for 24 h, colonies were counted, and the results expressed in CFU/mL.

2.5. Acidification Kinetics

The acidification profile was monitored for 24 h by the CINAC system (Cinétique d'Acidification) software (Ysebaert, Frépillon, France). Both monocultures and co-cultures were kept in a water bath without agitation at 37 °C in 250 mL Schott flasks (Schott Duran, Laborglas, São Paulo, SP, Brazil) containing 200 mL of MRS medium (for LABs producing bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS)) or M17 medium (for *S. thermophilus*). After the assessment of the acidification profile, the cultures were centrifuged at 4470 × g and 4 °C for 15 min to obtain the cell-free supernatant (CFS) for later determination of bacteriocin antimicrobial activity.

2.6. Determination of Antimicrobial Activity by the Critical Dilution Technique

To prevent the action of organic acids, the CFSs had their pH adjusted to 6.0–6.5 by addition of 1.0 M NaOH. They were then heated at 80 °C for 10 min to inactivate proteases, and sterilized by filtration in membranes with 0.20 µm pore diameter (Millipore, Billerica, MA, USA).

The antimicrobial activity of each BLIS was evaluated against the bioindicator strains *L. innocua* CLIST 2711, *C. maltaromaticum* CECT 4020, *S. aureus* CECT 239 and *E. coli* ATCC 25922, and the results were expressed in arbitrary units per milliliter (AU/mL). After serial dilution of CFSs (1:2, 1:4 and 1:8, v/v) in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 10 µL of each dilution were applied on the surface of plates containing TSB agar (0.75%, w/v) previously inoculated with the selected bioindicator strain (~ 10⁶ CFU/mL) and later incubated at 37 °C for 24 h. The first dilution in which there was no inhibition halo formation (*n*) was considered in the equation:

$$\text{AU/mL} = \frac{D^n \cdot 1000}{P} \quad (1)$$

where *D* is the dilution factor and *P* the volume of supernatant placed on the TSB agar medium.

2.7. Determination of Antimicrobial Activity Against Cariogenic Microorganism

To evaluate the potential anticariogenic effect of BLIS produced by LABs at different stages of bacterial growth, BLIS activity was also determined as ability to inhibit the growth of the *S. mutans* UA159 strain by the micro-dilution method using a microplate reader [25,26]. The assays were performed on sterile 96-well plate (TPP, Trasadingen, Switzerland) containing M17 (Difco) medium supplemented with 1.0% (w/v) lactose (100 µL), an aliquot of overnight culture of this pathogen (50 µL), and BLIS solution (50 µL), after pH correction to 6.0–6.5 with 1.0 M NaOH, thermal treatment for 10 min at 80 °C, and filter sterilization (0.22 µm). The resulting suspension (200 µL) was well mixed, and the microplate was incubated inside a microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA) at 37 °C. *S. mutans* growth was determined automatically every hour for 24 h on the microplate reader at OD_{600 nm}. BLIS activity was determined in triplicate.

2.8. Effect of Proteases, Solvents, Salts and Detergents on BLIS

To investigate the eventual protein nature of antimicrobial compounds, the CFSs were treated with 1.0 mg/mL trypsin, pepsin, or papain (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for 2 h at 37 °C. A 10 µL aliquot of BLIS solution prepared as described in the Section 2.6 was poured in a Petri dish containing *L. innocua* 2711 as a bio-indicator strain. The same volume of 1.0 mg/mL enzyme solution was poured in the Petri dish in such a way

that it would just partially cover BLIS [27]. The proteinaceous nature of BLIS was determined by the absence of inhibition halo against the bio-indicator strain.

To check BLIS stability, CFSs were treated in 1.0-mL conical tubes at 30 °C for 2 h with different organic solvents (acetonitrile and isopropanol), salts (sodium chloride and ammonium sulfate), and detergents (Triton X-100, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Tween 20, Tween 80, sodium dodecyl sulfate (SDS)) at a final concentration of 1.0% (w/v). In addition, BLIS was submitted to heat treatment at different temperatures, namely 30, 50, 70, and 90 °C for 1 h, or 120 °C for 15 min. After that, the BLIS stability was checked by the agar diffusion method against *L. innocua* 2711 [27].

2.9. BLIS Concentration by Precipitation with Ammonium Sulfate

After verification of protein nature of BLIS, they were concentrated by the salting-out technique. Precipitation was performed using 10 mL of each CFS by adding ammonium sulfate at six different concentrations (10, 20, 30, 40, 50, and 60% w/v). The antimicrobial activity of BLIS was then assessed to identify the optimal ammonium sulfate concentration to recover them. Afterwards, the tubes were vigorously mixed for 1 min and then incubated at 10 °C and 100 rpm for 1 h. After sample centrifugation at 4470 × g and 4 °C for 30 min, each precipitate was resuspended with 10% (v/v) of the initial volume (20 mL) of 25 mM ammonium acetate solution (pH 6.5) (Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brazil) [25], and sterilized by filtration through membranes with 0.22 µm pore diameter [27]. The antimicrobial activity of all concentrated BLIS was determined by the agar diffusion method.

3. Results and Discussion

3.1. Antimicrobial Activity of BLIS by the Critical Dilution Technique

The results of the antimicrobial activity of cell-free supernatants (CFSs) determined by the critical dilution technique showed that, among the BLIS-producing bacteria under investigation, *L. plantarum* ST16 PA and especially *B. lactis* BL 04 had the largest inhibitory effects against *L. innocua* 2711 (Table 1). Antimicrobials produced by *L. plantarum* ST16 Pa also showed efficiency in inhibiting different species of the genera *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, and *Listeria* [19]. In a similar study, *B. lactis* CFS was able to inhibit both *L. monocytogenes* and *E. coli* ATCC 25922 growth, thus demonstrating its antimicrobial potential against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [28].

Table 1. Antimicrobial activity, expressed in AU/mL, of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by the lactic acid bacteria (LAB) under investigation against different bioindicator strains.

BLIS-producing LAB	Bioindicator Strain			
	<i>Listeria innocua</i> 2711	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CECT 4020	<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 239	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Lactobacillus plantarum</i> ST16 Pa	3200	400	800	- ¹
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 33316	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> CECT-4434	800	-	-	-
<i>Bifidobacterium lactis</i> BL 04	6400	800	800	400
<i>Lactobacillus sakei</i> 2a	-	-	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i> 27	1600	800	3200	-

¹ No antimicrobial activity.

When compared to the other BLIS-producing LABs, *L. lactis* 27 exhibited the highest antimicrobial activity against *S. aureus* CECT 239, contrary to *L. lactis* CECT-4434 that showed no activity against this pathogen. *P. pentosaceus* ATCC 33316 and *L. sakei* subsp.

sakei 2a, although described in the literature as bacteriocin producers [29,30], did not exert any antimicrobial activity against the bioindicator strains tested in this study.

3.2. Kinetics of Lactic Bacteria Growth in Monocultures

The selected LABs showed quick initial growth, with start of the exponential phase after only 2 h of cultivation. The only exception to this was *L. plantarum* ST16 PA, which displayed a 6 h lag phase. Therefore, this strain suffered a reduction (4 log units) in cell concentration after 52 h of cultivation ($4.0 \pm 0.0 \times 10^5$ CFU/mL), compared to the beginning of the exponential phase ($3.2 \pm 0.0 \times 10^9$ CFU/mL), which was much larger than those observed for *L. lactis* CECT 4434, *L. lactis* 27 (1 log unit), and *B. lactis* BL04 (2 log units) (Figure 1).

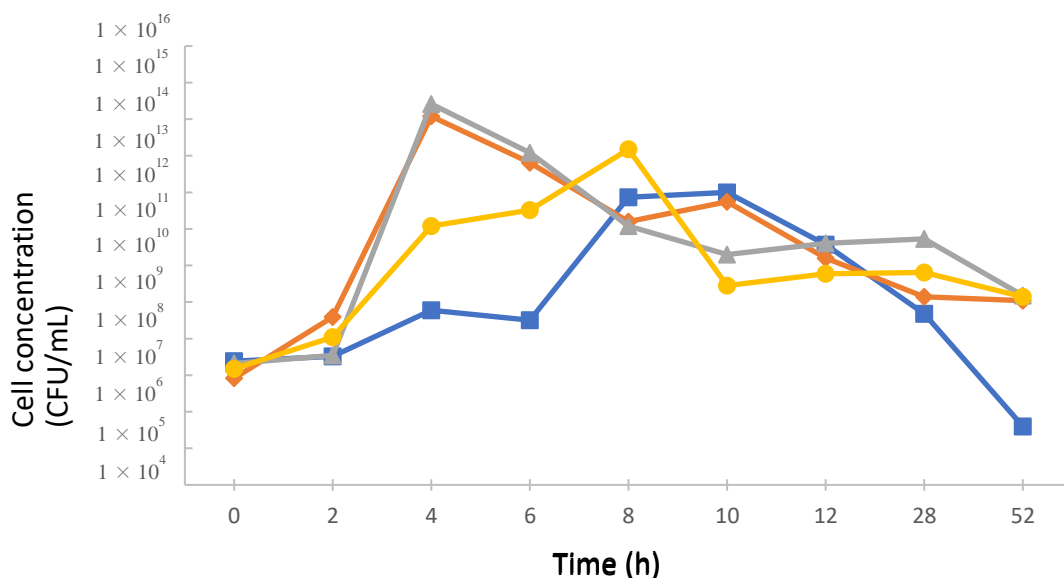


Figure 1. Cell concentration, expressed in colony forming units per milliliter (CFU/mL), of the lactic acid bacteria under investigation along 52-h cultivations. *Lactobacillus plantarum* ST16 A (■), *Lactococcus lactis* CECT-4434 (◆), *Bifidobacterium lactis* BL4 (▲), *Lactococcus lactis* 27 (●).

3.3. Antimicrobial Activity Against Cariogenic Microorganism

To evaluate the antimicrobial activity against the cariogenic *S. mutans* UA159 strain by the micro-dilution method, only the BLIS-producing LABs that were successful against non-cariogenic bioindicator strains were selected. Although all the selected LABs demonstrated antimicrobial activity against *S. mutans* UA159, *L. plantarum* ST16 Pa and *L. lactis* CECT-4434 ensured the most significant and promising results (Table 2).

Table 2. Antimicrobial activity of cell-free supernatants (CFS) from cultures of lactic acid bacteria (LABs) able to produce bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) against *Streptococcus mutans* UA159. Results were expressed by optical density (OD_{600 nm}).

BLIS-producing LAB	CFS ¹	CFS1 ²	CFS2 ³
<i>Lactobacillus plantarum</i> ST16 Pa	1.43	0.94	0.54
<i>Lactococcus lactis</i> CECT-4434	1.46	0.73	0.27
<i>Bifidobacterium lactis</i> BL 04	0.8	0.24	0.12
<i>Lactobacillus lactis</i> 27	1.29	0.64	0.32

¹ CFS = cell free supernatant; ² CFS1 = 1:1/2 (v/v) diluted cell free supernatant; ³ CFS2 = 1:1 (v/v) diluted cell free supernatant.

Figure 2 shows that the addition of CFS containing the *B. lactis* BL 04 BLIS delayed the growth of *S. mutans* UA159 by approximately 13 h compared to its cultivation without CFS, and that this effect was directly proportional to BLIS concentration. However, the

capability of the bioindicator strain to grow, although more slowly, even without any CFS dilution suggests that the BLIS effect was likely bacteriostatic rather than bactericidal. In addition, the effectiveness of this effect is demonstrated by the fact that it occurred even in the presence of the most diluted CFS (CFS2), leading to a reduction of no less than 40% of the final OD_{600 nm} compared to the culture without BLIS.

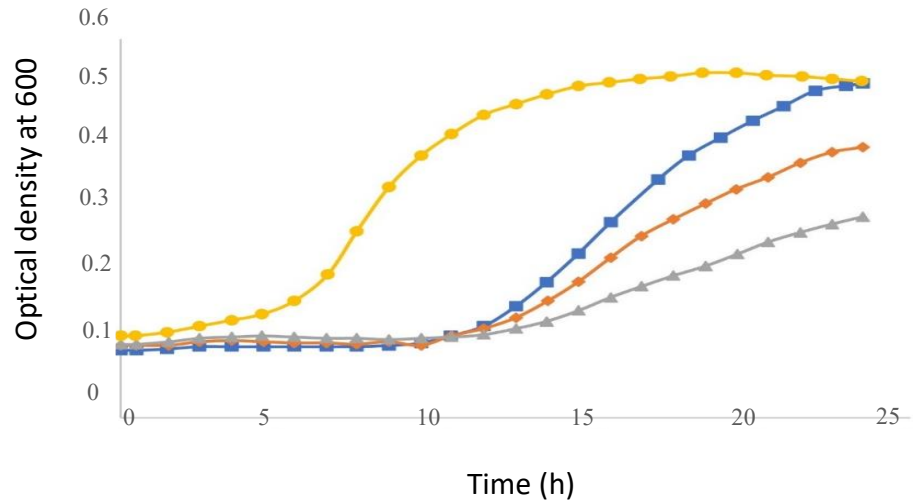


Figure 2. *Streptococcus mutans* UA159 growth curves in the absence (●) or in the presence of cell-free supernatant (CFS) from *Bifidobacterium lactis* BL 04 culture. CFS = CFS as such (▲), CFS1 = 1:1/2 (v/v) diluted CFS (◆), CFS2 = 1:1 (v/v) diluted CFS (■).

These results corroborate with the observations of a study in which the administration of *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 and *L. rhamnosus* GG allowed to control *S. mutans* development, thus reducing oral plaque and gingival inflammation in healthy young adults [17]. Similarly, Bhalla et al. [31] observed a significant reduction in *S. mutans* counts in saliva after 1 h and 7 days of *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 administration, confirming the anticariogenic power of this LAB.

As Figure 3 shows, the addition of CFS from *L. plantarum* ST16 PA culture, either as such or diluted, had an even more pronounced effect on *S. mutans* growth. In particular, while the most diluted CFS (CFS2) delayed in just a few hours the onset of the exponential phase compared to the run without BLIS, the least diluted one (CFS1) caused a delay as long as 17 h, and the undiluted one completely suppressed growth.

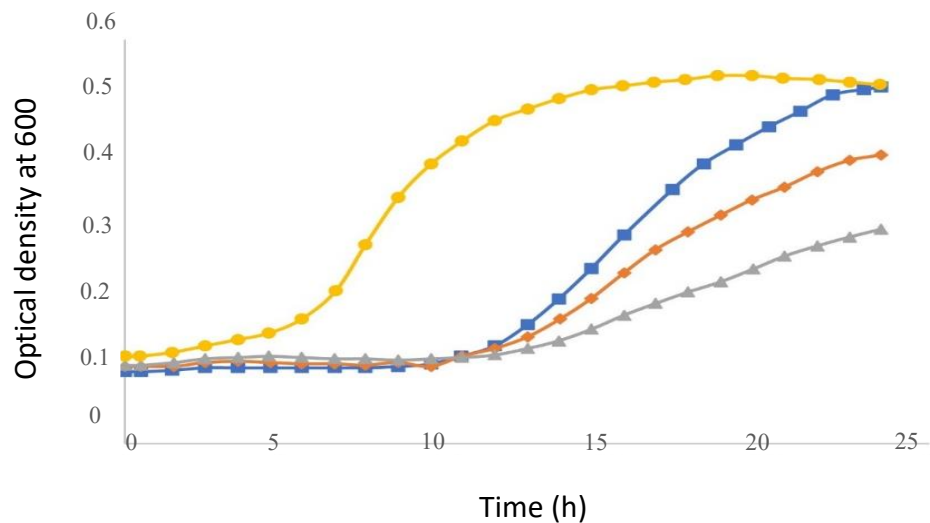


Figure 3. *Streptococcus mutans* UA159 growth curves in the absence (●) or in the presence of cell-free supernatant (CFS) from *Lactobacillus plantarum* ST16 Pa culture. CFS = CFS as such (▲), CFS1 = 1:1/2 (v/v) diluted CFS (◆), CFS2 = 1:1 (v/v) diluted CFS (■).

As a result, the reduction of OD_{600 nm} at the end of cultures (i.e., of the final concentration of *L. plantarum* ST16 Pa cells) was directly proportional to BLIS content in CFS. Similar results were reported against different species belonging to the genera *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus* [32].

Figures 4 and 5 illustrate the effects on the growth of the same pathogen of CFSs from *L. lactis* CECT-4434 and *L. lactis* 27 cultures, respectively. As expected by the fact that the two strains belong to the same species, the two antimicrobials showed similarity in their peculiar inhibition profile, which was characterized by no significant delay in the onset of the exponential phase, reduction in OD_{600 nm} at the end of cultures proportional to BLIS content in CFS, and total growth suppression in the presence of undiluted CFSs.

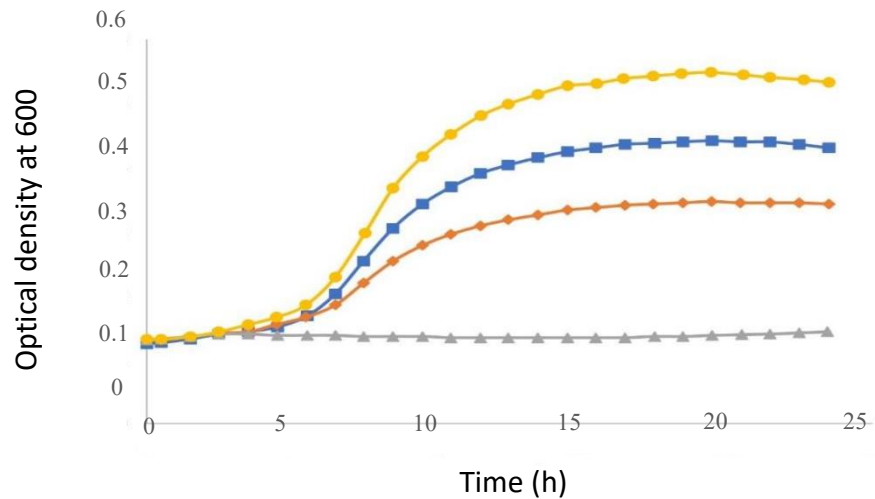


Figure 4. *Streptococcus mutans* UA159 growth curves in the absence (●) or in the presence of cell-free supernatant (CFS) from *Lactococcus lactis* CECT-4434 culture. CFS = CFS as such (▲), CFS1 = 1:1/2 (v/v) diluted CFS (◆), CFS2 = 1:1 (v/v) diluted CFS (■).

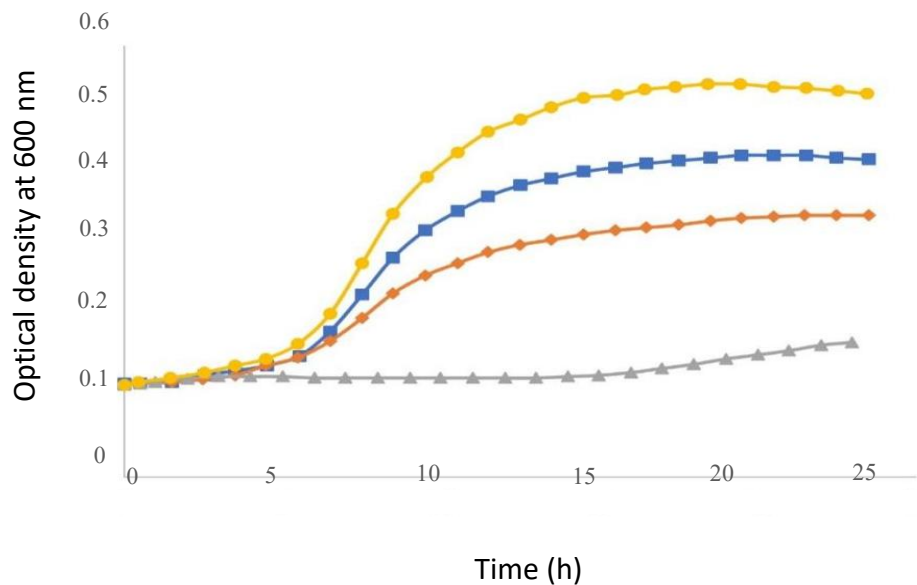


Figure 5. *Streptococcus mutans* UA159 growth curves in the absence (●) or in the presence of cell-free supernatant (CFS) from *Lactobacillus lactis* 27 culture. CFS = CFS as such (▲), CFS1 = 1:1/2 (v/v) diluted CFS (◆), CFS2 = 1:1 (v/v) diluted CFS (■).

In the study by Sudhir et al. [33], *L. acidophilus*, when administered in children for 30 days using curd as a vehicle, promoted significant reduction in *S. mutans* counts in saliva. The joint administration of *L. acidophilus* LA5 and *B. lactis* BB12 also significantly reduced the growth of *S. mutans* by 7 and 30 days after the ingestion of these probiotics by children

[34]. However, after 6 months of discontinuation of probiotic administration, *S. mutans* counts returned to the level observed at the beginning of the study, which means that there was no effective colonization of the oral cavity by these probiotics and that they should be constantly administered.

Comparing the results of this section, one can infer that the almost complete suppression of *S. mutans* UA159 growth evident in Figures 2–4 may have been the result of a bactericidal effect of BLIS produced by *L. plantarum* ST16 Pa, *L. lactis* CECT-4434, and *L. lactis* 27 cultures, unlike the bacteriostatic one evidenced in Figure 1 for *B. lactis* BL 04 BLIS. In addition, the absence of any delay of the exponential phase of the pathogen growth in Figures 3 and 4 suggests that the bactericidal action of *L. lactis* CECT-4434 and *L. lactis* 27 BLIS may have taken longer than those of BLIS produced by *L. plantarum* ST16 Pa and *B. lactis* BL 04 BLIS. However, any attempts to relate these different inhibition profiles with possible action mechanisms would require additional research effort.

3.4. Preliminary Characterization of BLIS

To investigate the chemical nature of BLIS, each CFS that exhibited antimicrobial activity in previous tests was treated separately with 1.0 mg/mL papain, pepsin and trypsin, and its antimicrobial activity was again tested against *L. innocua* 2711. The results showed that all enzyme treatments resulted in loss of antimicrobial activity, indicating the protein nature of all BLIS and suggesting that they could be class II bacteriocins [32].

To evaluate the stability of the protein compounds responsible for antimicrobial activity, the CFSs of *B. lactis* BL 04 and *L. lactis* 27 underwent treatments with different organic solvents (acetonitrile and isopropanol), salts (sodium chloride and ammonium sulfate), and detergents (Triton 100-X, EDTA, Tween 20, Tween 20 and SDS) and tested for their inhibitory effect against *L. innocua* 2711 (Table 3).

Table 3. Results of stability tests carried out on *Bifidobacterium lactis* BL 04 and *Lactobacillus lactis* 27 cell-free supernatants (CFSs) after treatment in different organic solvents, salts and detergents. Values refer to the post-treatment ability of CFSs to inhibit the growth of the pathogenic strain *Listeria innocua* 2711 expressed as diameter of inhibition halos (mm).

Treatment agent	<i>Bifidobacterium lactis</i> BL 04	<i>Lactobacillus lactis</i> 27
Acetonitrile	9.57 ± 0.09	9.41 ± 0.09
Isopropanol	11.29 ± 0.14	9.27 ± 0.08
Sodium chloride	11.45 ± 0.14	15.35 ± 0.13
Ammonium sulfate	7.81 ± 0.08	14.35 ± 0.12
Triton 100-X	15.07 ± 0.13	14.12 ± 0.12
EDTA	11.65 ± 0.11	15.92 ± 0.14
Tween 20	11.18 ± 0.10	13.54 ± 0.12
Tween 80	9.83 ± 0.09	12.35 ± 0.11
SDS	10.80 ± 0.10	8.23 ± 0.08
Water (control)	10.04 ± 0.10	8.85 ± 0.09

The inhibition halos generated by *B. lactis* BL 04 and *L. lactis* 27 CFSs after solvent treatment showed diameters (9.57–11.29 and 9.27–9.41 mm, respectively) close to those obtained using water as a control (10.04 and 8.85 mm, respectively), demonstrating that solvents did not influence the inhibitory effect of their respective BLIS. On the other hand, the *B. lactis* BL 04 BLIS suffered a small reduction in its antimicrobial effect after ammonium sulfate treatment (7.81 mm), while this same salt enhanced the effect of the *L. lactis* 27 one (14.35 mm). These results suggest that, despite the small decrease in antimicrobial activity observed in the former case, salting-out with ammonium sulfate could generally be a viable methodology as a first step for BLIS concentration and partial purification without significant losses of their activities.

Pathogenic bacteria such as *E. coli* and members of the *Listeria* genus are known to be important vehicles of diseases transmitted by contaminated foods [35]. The CFS

antimicrobial activity observed in this study corroborates the results of a recent study in which the *L. lactis* GH1 CFS proved to be able to inhibit the growth of *L. monocytogenes* ATCC 15,313 (1.55 ± 0.14 mm) [36] as the likely result of the production of organic acids, with consequent pH reduction, hydrogen peroxide, bacteriocins, or BLIS [37]. The stability of *L. lactis* 27 BLIS in organic solvents observed in this study is in line with the complete retention of *L. lactis* strains' antimicrobial activity reported in mixture with 10% (v/v) acetone, benzene, chloroform, dimethylsulfoxide, ethanol, ethyl acetate, and methanol [38]. On the other hand, the small loss of antimicrobial activity of *B. lactis* BL 04 CFS caused by the ammonium sulfate addition can be attributed to some change in protein three-dimensional structure of BLIS, which commonly leads to a loss of functionality and the formation of potentially immunogenic aggregates.

3.5. BLIS Production in Co-cultures

The results of monocultures showed that *B. lactis* BL 04 is the LAB, among those considered in this study, with the broadest spectrum of action against the tested bioindicator strains, including *L. innocua* 2711. Therefore, it was grown in co-culture with *S. thermophilus* TA040, which previously displayed synergism in co-culture with *L. rhamnosus* by significantly reducing the acidification time [39]. The results of the antimicrobial activity of the CFS of this co-culture against *L. innocua* 271 are gathered in Table 4 and compared to those of the respective monocultures.

Table 4. Antimicrobial activity (AU/mL) against *Listeria innocua* 2711 of the cell-free supernatants from monocultures and co-culture of *Bifidobacterium lactis* BL 04 and *Streptococcus thermophilus* TA040.

Culture	Antimicrobial activity (AU/mL)
<i>Bifidobacterium lactis</i> BL 04	6400
<i>Streptococcus thermophilus</i> TA040	1600
<i>Bifidobacterium lactis</i> BL 04 + <i>Streptococcus thermophilus</i> TA040	12,800

The CFS from *S. thermophilus* TA040 monoculture showed low antimicrobial activity when using MRS broth supplemented with 1.0% (w/v) L-cysteine and 0.04% (w/v) sodium thioglycolate (1600 AU/mL), and even null antimicrobial activity when using the M17 medium, thus corroborating the absence of reports in the literature on antimicrobial activity of this strain. On the contrary, the antimicrobial activity of CFS from *B. lactis* BL 04 monoculture was remarkable (6400 AU/mL) and coincided with the one determined using the critical dilution technique. When this microorganism was cultivated in co-culture with *S. thermophilus* TA040, the CFS antimicrobial activity doubled (12,800 AU/mL) compared to its monoculture, proving the previously supposed synergism [39].

It is known that the acidification ability of probiotic strains is one of the most significant technological characteristics of starter cultures, particularly in the manufacture of milk-based products, because the pH reduction inhibits the growth of a large number of pathogenic microorganisms and/or microorganisms responsible for deterioration of fermented products, thus improving their storage properties [36].

As illustrated in Figure 6, the *B. lactis* BL 04 and *S. thermophilus* TA040 co-culture shortened the acidification time (i.e., the time to lower the pH from 5.8 to 4.3) by approximately 8 h compared to the *B. lactis* BL 04 monoculture (24 h), while *S. thermophilus* TA040 alone could not achieve this goal even at the end of cultivation.

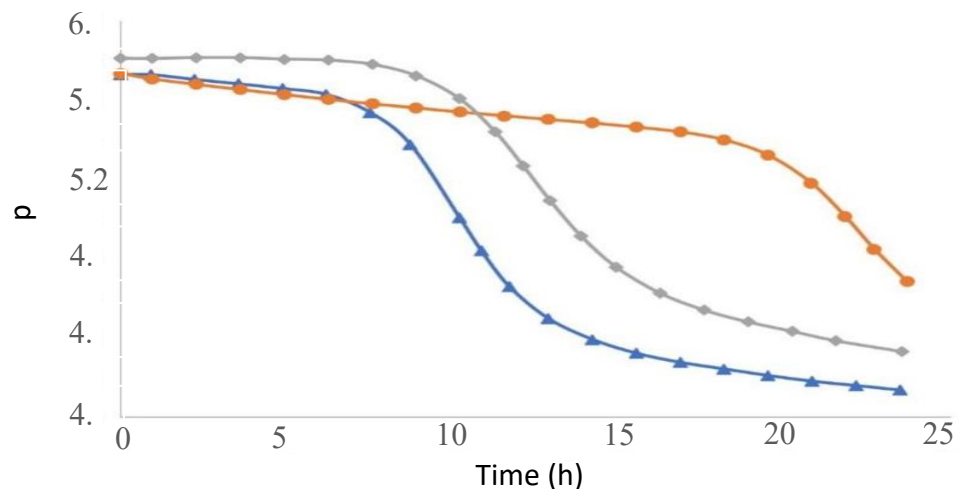


Figure 6. Acidification profiles of monocultures of *Streptococcus thermophilus* TA040 (●) and *Bifidobacterium lactis* BL 04 UA159 (◆) as well as of their co-culture (▲).

3.6. BLIS Concentration and Partial Purification by Salting Out with Ammonium Sulfate

Table 5 shows the results of the antimicrobial activity of the CFSs from *L. lactis* 27 and *B. lactis* BL 04 monocultures after BLIS concentration with ammonium sulfate at different concentrations (10, 20, 30, 40, 50, 60% w/v).

Table 5. Antimicrobial activity (AU/mL) against *Listeria innocua* 2711 of the cell-free supernatants from *Bifidobacterium lactis* BL 04 and *Lactobacillus lactis* 27 monocultures after precipitation with ammonium sulfate at different concentrations (% w/v).

Ammonium sulfate concentration (% w/v)	<i>Bifidobacterium lactis</i> BL 04	<i>Lactobacillus lactis</i> 27
10	3200	800
20	6400	3200
30	12,800	3200
40	25,600	3200
50	51,200	6400
60	102,400	6400

In both cases the strongest antimicrobial activity was obtained using the largest dosage of ammonium sulfate (60%, w/v), but that of *B. lactis* BL 04 BLIS (102,400 AU/mL) was nothing less than 15 times higher than that of *L. lactis* 27 BLIS. These results suggest that the BLIS produced by this bifidobacterium was insensitive to possible changes induced by the salting out process in its protein three-dimensional structure and may be successfully exploited to hinder the development of pathogens.

4. Conclusions

The results of this study showed that, among the selected lactic acid bacteria (LABs), *Lactobacillus plantarum* ST16 Pa, *Bifidobacterium lactis* BL 04, *Lactococcus lactis* CECT-4434, and *Lactobacillus lactis* 27 were able to produce bacteriocin-like substances (BLIS), unlike *Pediococcus pentosaceus* ATCC 33316 and *Lactobacillus sakei* 2a. Among them, *B. lactis* BL 04 was the LAB with the largest spectrum of antimicrobial activity, being able to inhibit the growth of *Listeria innocua* 2711, *Carnobacterium maltaromaticum* CECT 4020, *Staphylococcus aureus* CECT 239, and *Escherichia coli* ATCC 25922. On the other hand, *L. plantarum* ST16 Pa and *L. lactis* CECT-4434 showed the greatest antimicrobial effect against the cariogenic pathogen *Streptococcus mutans* UA159. *B. lactis* BL 04 antimicrobial activity was two times

higher than those of the other LABs, and the acidification time was significantly reduced when this bacterium was cultivated in co-culture with *Streptococcus thermophilus* TA040, which suggests a possible synergistic effect between these two microorganisms.

The antimicrobial activities of *L. lactis* 27 and *B. lactis* BL 04 BLIS after ammonium sulfate precipitation increased proportionally to the concentration of this salt up to 60% w/v. However, the activity of latter (102,400 AU/mL) was 15 times higher than the one of former, suggesting that the *B. lactis* BL 04 BLIS may have been insensitive to possible three-dimensional changes induced by the salting-out process. The results of this study also indicate the potential application of *B. lactis* BL 04 BLIS, produced either in monoculture or in co-culture with *S. thermophilus* TA040, to prevent the development of pathogens.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.S.d.S. and R.P.d.S.O.; methodology, A.R.S.d.S. and P.O.d.S.d.A.; validation, P.O.d.S.d.A., R.P.d.S.O. and A.C.; formal analysis, P.O.d.S.d.A., R.P.d.S.O. and A.C.; investigation, A.R.S.d.S.; resources, R.P.d.S.O.; data curation, P.O.d.S.d.A. and A.C.; writing—original draft preparation, A.R.S.d.S.; writing—review and editing, P.O.d.S.d.A., R.P.d.S.O. and A.C.; visualization, P.O.d.S.d.A. and A.C.; supervision, R.P.d.S.O.; project administration, R.P.d.S.O.; funding acquisition, R.P.d.S.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors are grateful for the financial support of São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant 2018/25511-1] and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [grants 870258/1997-4; 312923/2020-1; 408783/2021-4].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Belda-Ferre, P.; Alcaraz, L.D.; Cabrera-Rubio, R.; Romero, H.; Simón-Soro, A.; Pignatelli, M.; Mira, A. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* **2012**, *6*, 46–56. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.85>.
- Marsh, P.D.; Zaura, E. Dental biofilm: Ecological interactions in health and disease. *J. Clin. Periodontol.* **2017**, *44*, S12–S22. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12679>.
- GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7).
- Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Ben Omar, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *120*, 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>.
- Lata, S.; Varghese, N.O.; Varughese, J.M. Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *J. Conserv. Dent.* **2010**, *13*, 42–46. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.62634>.
- Rubaba, M.; Muhamma, H.; Amin, N.S.; Deog-Hwan, O. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *105*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.023>.
- Mealey, B.L. Influence of periodontal infections on systemic health. *Periodontol.* **2000** **1999**, *21*, 197–209. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00176.x>.
- Willis, J.R.; Gabaldón, T. The human oral microbiome in health and disease: From sequences to ecosystems. *Microorganisms* **2020**, *8*, 308. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308>.
- Haque, M.; Sartelli, M.; Haque, S.Z. Dental infection and resistance-global health consequences. *Dent. J.* **2019**, *7*, 22. <https://doi.org/10.3390/dj7010022>.
- Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations Food Safety and Quality: Probiotics. Available online: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/> (accessed on 24 July 2022).
- Sabatini, S.; Lauritano, D.; Candotto, V.; Silvestre, F.J.; Nardi, G.M. Oral probiotics in the management of gingivitis in diabetic patients: A double blinded randomized controlled study. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **2017**, *31*, 197–202.
- Tekce, M.; Ince, G.; Gursoy, H.; Dirikan Ipci, S.; Cakar, G.; Kadir, T.; Yilmaz, S. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: A 1-year follow-up study. *J. Clin. Periodontol.* **2015**, *42*, 363–372. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12387>.

13. Keller, M.K.; Brandsborg, E.; Holmstrom, K.; Twetman, S. Effect of tablets containing probiotic candidate strains on gingival inflammation and composition of the salivary microbiome: A randomised controlled trial. *Benef. Microbes*. **2018**, *9*, 487–494. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0104>.
14. Nadkerny, P.V.; Ravishankar, P.L.; Pramod, V.; Agarwal, L.A.; Bhandari, S. A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2015**, *19*, 633–639. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.168491>.
15. Grusovin, M.G.; Bossini, S.; Calza, S.; Cappa, V.; Garzetti, G.; Scotti, E.; Gherlone, E.F.; Mensi, M. Clinical efficacy of *Lactobacillus reuteri*-containing lozenges in the supportive therapy of generalized periodontitis stage III and IV, grade C: 1-year results of a double-blind randomized placebo-controlled pilot study. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 2015–2024. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03065-x>.
16. Oliveira, L.F.; Salvador, S.L.; Silva, P.H.; Furlaneto, F.A.; Figueiredo, L.; Casarin, R.; Ervolino, E.; Palioto, D.B.; Souza, S.L.S.; Jr Taba, M.; et al. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* probiotic in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* **2017**, *88*, 197–208. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160217>.
17. Toiviainen, A.; Jalasvuori, H.; Lahti, E.; Gursøy, U.; Salminen, S.; Fontana, M.; Flannagan, S.; Eckert, G.; Kakaras, A.; Paster, B.; et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin. Oral Investig.* **2015**, *19*, 77–83. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1221-6>.
18. Invernici, M.M.; Salvador, S.L.; Silva, P.H.F.; Soares, M.S.M.; Casarin, R.; Palioto, D.B.; Souza, S.L.S.; Jr Taba, M.; Jr Navaes, A.B.; Furlaneto, F.A.C.; et al. Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 1198–1210. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12995>.
19. Sabo, S.S.; Vitolo, M.; Domínguez González, J.M.; Oliveira, R.P.S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041>.
20. Balciunas, E.M.; Al Arni, S.; Converti, A.; Leblanc, J.G.; Oliveira, R.P.S. Production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Bifidobacterium lactis* using whey as a substrate. *Int. J. Dairy Technol.* **2016**, *69*, 236–242. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12247>.
21. Porto, M.C.W.; Kuniyoshi, T.M.; Azevedo, P.O.S.; Vitolo, M.; Oliveira, R.P.S. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 365–374, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>.
22. Seminario-Amez, M.; Lopez-Lopez, J.; Estrugo-Devesa, A.; Ayuso-Montero, R.; Jane-Salas, E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* **2017**, *22*, e282–e288. <https://doi.org/10.4317/medoral.21494>.
23. Sivamaruthi, B.S.; Kesika, P.; Chaiyasut, C. A review of the role of probiotic supplementation in dental caries. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2020**, *12*, 1300–1309. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09652-9>.
24. Veiga, P.; Suez, J.; Derrien, M.; Elinav, E. Moving from probiotics to precision probiotics. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 878–880. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0721-1>.
25. Piazzentin, A.C.M.; Mendonça, C.M.N.; Vallejo, M.; Mussato, S.I.; Oliveira, R.P.S. Bacteriocin-like inhibitory substances production by *Enterococcus faecium* 135 in co-culture with *Ligilactobacillus salivarius* and *Limosilactobacillus reuteri*. *Braz. J. Microbiol.* **2022**, *53*, 131–141. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00661-6>.
26. Pereira, W.A.; Piazzentin, A.C.M.; Oliveira, R.C.; Mendonça, C.M.N.; Tabata, Y.A.; Mendes, M.A.; Fock, R.A.; Makiyama, E.N.; Corrêa, B.; Vallejo, M.; et al. Bacteriocinogenic probiotic bacteria isolated from an aquatic environment inhibit the growth of food and fish pathogens. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 5530. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09263-0>.
27. Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process. Biochem.* **2006**, *41*, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.026>.
28. Martinez, F.A.C.; Domínguez, J.M.; Converti, A.; Oliveira, R.P.S. Production of bacteriocin-like inhibitory substance by *Bifidobacterium lactis* in skim milk supplemented with additives. *J. Dairy Res.* **2015**, *82*, 350–355. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000163>.
29. Carvalho, K.G.; Bambirra, F.H.S.; Nicoli, J.R.; Oliveira, J.S.; Santos, A.M.C.; Bemquerer, M.P.; Miranda, A.; Franco, B.D.G.M. Characterization of multiple antilisterial peptides produced by sakacin P-producing *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 635–644. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1477-3>.
30. Maria, P.; Sofia, A. Pediocins: The bacteriocins of pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microb. Cell Fact.* **2009**, *8*, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-3>.
31. Bhalla, M.; Ingle, N.A.; Kaur, N.; Yadav, P. Mutans streptococci estimation in saliva before and after consumption of probiotic curd among school children. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **2015**, *5*, 31–34. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.151970>.
32. Todorov, S.D.; Prévost, H.; Lebois, M.; Dousset, X.; LeBlanc, J.G.; Franco, B.D.G.M. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)-From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1351–1363. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.027>.
33. Sudhir, R.; Praveen, P.; Anantharaj, A.; Venkataraghavan, K. Assessment of the effect of probiotic curd consumption on salivary pH and *Streptococcus mutans* counts. *Niger. Med. J.* **2012**, *53*, 135–139. <https://doi.org/10.4103/0300-1652.104382>.
34. Ashwin, D.; Ke, V.; Taranath, M.; Ramagoni, N.K.; Nara, A.; Sarpangala, M. Effect of probiotic containing ice-cream on salivary mutans streptococci (SMS) levels in children of 6–12 years of age: A randomized controlled double blind study with six-months follow up. *J. Clin. Diagn. Res.* **2015**, *9*, ZC06–ZC09. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10942.5532>.

35. Alegbeleye, O.O.; Singleton, I.; Sant'Ana, A.S. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiol.* **2018**, *73*, 177–208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>.
36. Jawan, R.; Abbasiliasi, S.; Mustafa, S.; Kapri, M.R.; Halim, M.; Ariff, A.B. In vitro evaluation of potential probiotic strain *Lactococcus lactis* Gh1 and its bacteriocin-like inhibitory substances for potential use in the food industry. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 422–440. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09690-3>.
37. Nishant, T.; Sathish Kumar, D.; Arun Kumar, R.; Hima Bindu, K.; Raviteja, Y. Bacteriocin producing probiotic lactic acid bacteria. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2011**, *3*, 121–124. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000062>.
38. Barman, S.; Ghosh, R.; Mandal, D.C. Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Ann. Agrar. Sci.* **2018**, *16*, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.05.004>.
39. Oliveira, R.P.S.; Perego, P.; Nogueira, M.; Oliveira, D.; Converti, A. Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT-Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.031>.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que, entre as bactérias ácido-láticas testadas, *Lactiplantibacillus plantarum* ST16Pa, *Bifidobacterium lactis* BL 04, *Lactococcus lactis* CECT-4434 e *Lactobacillus lactis* 27 produziram BLIS e entre elas, *B. lactis* BL 04 foi a cepa que apresentou o mais amplo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *Listeria innocua* 2711 e *Staphylococcus aureus* CECT 239.

Já as cepas *L. plantarum* ST16Pa e *L. lactis* CECT-4434 mostraram as maiores atividades anticariogênicas contra *Streptococcus mutans* UA159. A atividade antimicrobiana de *B. lactis* BL 04 dobrou e o tempo de acidificação foi notavelmente reduzido quando esta cepa foi cultivada em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* TA040 sugerindo que, o sinergismo do metabolismo desta bactéria com o de outras bactérias ácido láticas pode ter exaltado a produção de bacteriocina por *B. lactis* BL 04.

A atividade antimicrobiana do BLIS de *Lactobacillus lactis* 27 e *Bifidobacterium lactis* BL 04 após precipitação com sulfato de amônio aumentou proporcionalmente à concentração de sal.

Devido às suas características singulares como, por exemplo, seu espectro de ação antimicrobiano, as bactérias ácido-láticas, têm se tornado atrativas à indústria alimentícia, como bioconservantes de alimentos, e também à indústria farmacêutica, como uma possível alternativa ao uso de antibióticos. Consequentemente, tais aplicações precisam de grandes investimentos na área de pesquisa em busca de cepas de BAL que sejam potencialmente produtoras de novas bacteriocinas e outros compostos, que tenham aplicação biotecnológica em diversas áreas, inclusive na odontologia.

6 DISCIPLINAS, EVENTO E OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS

6.1 Considerações sobre a pandemia

Em 11 de março de 2020, a disseminação do vírus Sars-Cov-2 foi caracterizada pela OMS como uma pandemia e seus impactos em todos os âmbitos sociais não poderiam ser previstos. Até aqui, tentamos contar perdas imensuráveis. A ciência nunca foi tão discutida e escrutinada pela opinião pública, antes tão alheia a seus métodos e no meio disso continuamos tentando fazer essa ciência que é base para tantas tecnologias que nos permitem ser em sociedade.

Por mais que a fase de mortandade tenha, felizmente, cessado, não devemos esquecer tão cedo seus impactos que continuarão abalando nossas bases sociais e projetos individuais. Assim, cabe destacar os impactos sentidos no desenvolvimento das atividades científicas referentes ao presente projeto de pesquisa.

Como consequência se refletiram sobre entrega de materiais e reagentes, essenciais à execução de experimentos; impossibilidade de obtenção das amostras de animais para o projeto; restrições alfandegárias ao recebimento de amostras biológicas fornecidas por parceiros internacionais, entre outras.

Conforme o Plano USP para o Retorno Gradual das Atividades Presenciais, a frequência no laboratório só pôde ser iniciada a partir de julho de 2021. Durante o decorrer desses 14 meses foram realizados os cumprimentos de créditos obrigatórios, participação em eventos e demais atividade que puderam ser realizadas.

6.2 Atividades Realizadas

Ao longo dos dois primeiros semestres em período pandêmico, com acesso restrito à universidade, o comprimento dos vinte créditos obrigatórios requeridos pelo programa de pós-graduação foi realizado de forma remota em diversas unidades da universidade, a fim de obter os conhecimentos complementares para da elaboração da tese. As disciplinas cursadas e conceitos estão apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Disciplinas cursadas para obtenção dos créditos obrigatórios

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5738-2/1	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	01/04/2019	15/07/2019	60	4	100	A	N	Concluída
BTC5743-4/2	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	14/08/2019	26/11/2019	30	2	85	B	N	Concluída
ESC5710-2/1	Preparação Pedagógica (Escola de Artes, Ciências e Humanidades - Universidade de São Paulo)	15/08/2019	06/11/2019	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBT5719-1/1	Segurança Química e Biossegurança: gerenciamento de laboratórios	14/10/2019	27/10/2019	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5768-5/2	Princípios de Fermentação Contínua	04/02/2020	09/03/2020	75	5	90	A	N	Concluída
BTC5827-2/1	Fungos e Biotecnologia (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	10/03/2020	20/04/2020	60	4	100	A	N	Concluída
BTC5721-5/4	Tópicos Avançados em Química de Proteínas e Peptídeos para Aplicação Biotecnológica (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	31/03/2020	11/05/2020	90	0	-	-	N	Turma cancelada
ODE5790-2/1	Microbiologia e Imunologia das Doenças Periodontais (Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo)	06/05/2020	16/06/2020	60	4	100	A	N	Concluída

Fonte: O autor.

Outras atividades como a participação da doutoranda, que incluem a organização de eventos científicos e cursos *online*, estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Participação e organização de eventos científicos e cursos.

Evento	Instituição	Função	Data	Duração
Curso de Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório	Universidade de São Paulo	Aluna	2021	60H
Monitora no programa PAE	Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP	Monitora	Segundo semestre de 2020	Um semestre
Aula sobre Antimicrobianos e Controle de Qualidade no IV Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP	Ministrante	Julho de 2019	20H
Curso em Microbiologia Clínica	Faculdade São Camilo	Aluna	Maio de 2022	40H
IV Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – FCF/USP	Organizador e Palestrante	Julho de 2019	20H

Cuidado em Saúde Bucal da pessoa com doença infecciosa	UNA-SUS	Aluna	Outubro de 2022	60H
Organização do SUS	UNA-SUS	Aluna	Outubro de 2022	45H
Ciência de Animais de Laboratório (Workshop em Bioterismo)	ICB-USP	Aluna	Novembro de 2022	30H
XI Proteomics Workshop	CNEPEM	Aluna	Novembro de 2022	20H

Fonte: O autor.

7 REFERÊNCIAS

Aas A, Bruce JP, Lauren NS, Ingar O, Floyd ED. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Clinical Microbiology* 2015; 44(12):5722-33.

Albuquerque-Souza, E., Balzarini, D., Ando-Suguimoto, E., Ishikawa, K.H., Simionato, M.R.L., Holzhausen, M., Mayer, M.P.A. Probiotics alter the immune response of gingival epithelial cells challenged by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.* 2018.

Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R., Klaenhammer, T.R., 2004. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3906–3912.

Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Converti, A., Oliveira, R. P.S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134-142.

Barefoot, S. F., Klaenhammer, T. R. (1984). Purification and Characterization of the *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin Lactacin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26, 328-334.

Béal, C., Spinnler, H., Corrieu, G. (1994). Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 398, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 95–98.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(6):588-94.

Bogovic-Matijasić, B., Rogelj, I., Nes, I.F., Holo, H., 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 606– 612.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes da Política Nacional de Saúde Bucal. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

CARVALHO, Danusa Queiroz; ELY, Helenita Corrêa; PAVIANI, Leonardo Soldatelli; CORRÊA, Paulo Eduardo Bettega. A Dinâmica da Equipe de Saúde Bucal no Programa Saúde da Família – Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Boletim da Saúde, 2004.

Caufield, P.W., Schön, C.N., Saraithong, P., Li, Y., Argimón, S., 2015. Oral Lactobacilli and Dental Caries. *J. Dent. Res.* 94, 110S–118S. doi:10.1177/0022034515576052.

Cavera, V.L., Arthur, T.D, Kashtanov, D., Chikindas, M.L. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:494–501.

Chapman, C. M. C., Gibson, G. R., Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition*, 50(1), 1–17.

Chatterjee, P., Chiasson, V.L., Bounds, K.R., Mitchell, B.M. (2014). Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front Immunol.* 27;5:253.

Chumchalová, J., Josephsen, J., Plocková, M., 2004. Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1082–1089.

Cirkovic I, Bozic DD, Draganic V, et al. Licheniocin 50.2 and Bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 Inhibit Biofilms of Coagulase Negative Staphylococci and *Listeria monocytogenes* Clinical Isolates. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167995. Published 2016 Dec 8. doi:10.1371/journal.pone.0167995

Chen, S., Liu, C., Huac, S. (2019) Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against

Aeromonas hydrophila and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 695-703.

Cogolu D, Topaloglu-Aka A, Caglar E, Sandalli N, Karagozlu C, Ersin N. Potential effects of a multistrain probiotic-kefir on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Dental Sciences* 2010; 5(3):144-9.

Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(10):777-788. doi:10.1038/nrmicro1273

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56–67.

Diez-Gonzalez, F. (2007). Applications of bacteriocins in livestock. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(1), 15–23.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988;15:316-323

Elavarasu S, Suthanthiran T, Thangavelu A, Kanagaraj SS, Mohandas L, Sekar S. Evaluation of efficacy of probiotic (BI-FILAC) on *Porphyromonas gingivalis*: In vitro study. *Pharmacy & Bioallied Sciences* 2016; 8(Suppl 1):S45-S7.

FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, ON, Canada, <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

FAO (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>.

FERREIRA, C. L. F. Grupo de bactérias ácido lácticas– caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In:Prebióticos e Probióticos: Atualização e prospecção. Editor. Célia L. L. F. Ferreira. Viçosa, MG, 2003, 206p

G. Ünlü, B. Nielsen, C. Ionita. Production of antilisterial bacteriocins from lactic acid bacteria in dairy-based media: a comparative study
Probiotics Antimicrob. Proteins, 7 (2015), pp. 259-274, [10.1007/s12602-015-9200-z](https://doi.org/10.1007/s12602-015-9200-z)

Gruner, D., Paris, S., Schwendicke, F. (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 48, 16–25.

Goulbourne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Bacteriol* 1991;173:5266-5274

Harriott MM, Noverr MC. Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* 2011;19(11):557-63.

Haque, M.; Sartelli, M.; Haque, S.Z. Dental Infection and Resistance-Global Health Consequences. *Dent. J.* 2019, 7, 22. [CrossRef] [PubMed]

Hill, C., F. Guarner, G. Reid, G. R. Gibson, D. J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, R. B. Canani, H. J. Flint, S. Salminen, P. C. Calder, M. E. Sanders. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.

HOLT, J. G. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: Willians and Wilkins, v. 4, 1989

Holz C, Alexander C, Balcke C, Moré M, Auinger A, Bauer M, et al. *Lactobacillus paracasei* DSMZ16671 Reduces Mutans Streptococci: a short-term pilot study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins. Probióticos Antimicrob Proteins* 2013; 5(4):259-63.

Imran F, Padmanabhan S, Rao R, Suresh A, Bharath D. Evaluation of the efficacy of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* on the levels of periodontopathic bacteria in periodontitis: a clinico-microbiologic study. *Indian J Dent Res* 2015; 26(5):462-8.

Ishikawa, K.H., Mita, D., Kawamoto, D., Simionato, M.R.L., Mayer, M.P.A. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* probiotics inhibit biofilm formation and alter virulence genes transcription profile of *Porphyromonas gingivalis*. Artigo Submetido.

Jain, P.K., McNaught, C.E., Anderson, A.D., MacFie, J., Mitchell, C.J., 2004. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clinical Nutrition* 23, 467–475.

Jalasvuori H, Haukioja A, Tenovuori J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* strains ATCC PTA 5289 and ATCC 55730 differ in their cariogenic properties in vitro. *Arch Oral Biol* 2012; 57(12):1633-8.

Jäsberg H, Söderling E, Endo A, Beighton D, Haukioja A. Bifidobacteria inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. *Eur J Oral Sci* 2016; 124(3):251-8.

J.A. Reis, A.T. Paula, S.N. Casarotti, A.L.B. Penna Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications *Food Eng. Rev.*, 4 (2012), pp. 124-140, [10.1007/s12393-012-9051-2](https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2)

Jeevaratnam, K.; Jamuna, M.; Bawa, A. S. (2005) Biological preservation of foods – bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 446-454.

Kim, O. Y., Mahboob, S., Viayaraghavan, P., Biji, D., Al-Ghanim, K. A., Al-Misned, F., Ahmed, Z., Kwon, J., Na, S. W., Kim, H. (2020) Growth promoting activity of *Penaeus indicus* by secondary metabolite producing probiotic bacterium *Bacillus subtilis* isolated from the shrimp gut. *Journal of King Saud University – Science*, 32, 1641-1646.

Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., Patel, S. (2019) Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177.

Lamont, R. J. and H. F. Jenkinson (1998). "Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*." *Microbiol Mol Biol Rev*62(4): 1244-1263.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL. V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*,19, 597-625, 2001

Lee, S-H., Baek, D-H. (2014). Effects of *Streptococcus thermophilus* on volatile sulfur compounds produced by *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of oral biology*, 59, 1205

Le Blanc, J. G., Laiño, J. E., Juarez del Valle, M., Vannini, V., Van Sinderen, D., Taranto, M. P., Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1297-1309.

Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Converti, A., Cotter, P.D., Oliveira, R.P.S. (2013a). Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances*, 31, 482–488.

Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., González, J.M.D., Converti, A., Oliveira, R. P.S. (2013b). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 70-83.

Marttinen, A., Haukioja, A., Karjalainen, S., Nylund, L., Satokari, R., Öhman, C., Holgerson, P., Twetman, S., Söderling, E., 2012. Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clin. Oral Investig.* 16, 797–803. doi:10.1007/s00784-011-0584-1

Matsumoto, M., Tsuji, M., Sasaki, H., Fujita, K., Nomura, R., Nakano, K., Shintani, S., Ooshima, T., 2005. Cariogenicity of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus salivarius* in Rats. *Caries Res.* 39, 479–483. doi:10.1159/000088183

Melo TA, dos Santos TF, de Almeida ME, Junior LAGF, Andrade EF, Rezende RP, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiology* 2016; 16:250.

Mendi A, Köse S, Uçkan D, Akca G, Yilmaz D, Aral L, et al. *Lactobacillus rhamnosus* could inhibit *Porphyromonas gingivalis* derived CXCL8 attenuation. *Applied Oral Science* 2016; 24(1):67-75.

MILLER JK et al. Nanoparticle deposition onto biofilms. *Ann Biomed Eng.* 2013;41(1):53-67

N.L. Sidek, M. Halim, J.S. Tan, S. Abbasiliasi, S. Mustafa, A.B. Ariff Stability of bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Pediococcus acidilactici* kp10 at different extreme conditions *BioMed Res. Int.* (2018), pp. 1-11, [10.1155/2018/5973484](https://doi.org/10.1155/2018/5973484)

Oliveira, R.P.S.; Perego, P.; Converti, A.; Oliveira, M. N. (2011a). Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 520-523.

Oliveira R. P. S., Florence, A. C. R., Perego, P., Oliveira, M. N., Converti, A. (2011b). Use of lactulose as probiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 520-523.

Oliveira, R.P.S., Torres, B.R., Perego, P., Oliveira, M.N., Converti, A. (2012a). Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, 62, 62– 69.

Oliveira, R.P.S., Perego, P., Oliveira, M.N., Converti, A. (2012b). Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The inulin effect. *Food Research International*, 48, 21–27.

Oliveira, R.P.S., Perego, P., Oliveira, M.N., Converti, A. (2012c). Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 358-363.

Palombo, E.A., A., E., 2011. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2011, 680354. doi:10.1093/ecam/nep067

PELGRIFT RY, FRIEDMAN AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(13-14):1803-15.

Petti, S., Tarsitani, G., Simonetti D'Arca, A. Antibacterial activity of yoghurt against viridans streptococci in vitro. *Arch Oral Biol* 2008;53(10):985–90.

PINTO, Vitor. *Saúde Bucal Coletiva*. São Paulo: Livraria Santos, 2008.

Porto M.C, Kuniyoshi T.M, Azevedo P.O.S, Vitolo, M, Oliveira R.P.S. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 2017.

R. Jawan, S. Abbasiliasi, S. Mustafa, M.R. Kapri, M. Halim, A.B. Ariff In vitro evaluation of potential probiotic strain *Lactococcus lactis* Gh1 and its bacteriocin-like inhibitory substances for potential use in the food industry. *Probiotics antimicrob Proteins*, 13 (2021), pp. 422-440, [10.1007/s12602-020-09690-3](https://doi.org/10.1007/s12602-020-09690-3)

Sabo, S. S., Pérez-Rodríguez, N., Domínguez, J. M., Oliveira, R. P. S. (2017). Inhibitory substances production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa cultured in hydrolyzed cheese whey supplemented with soybean flour and their antimicrobial efficiency as biopreservatives on fresh chicken meat. *Food Research International*, 99(1), 762-769.

Saiz, P.; Taveira, N.; Alves, R. Probiotics in Oral Health and Disease: A Systematic Review. *Appl. Sci.* 2021, 11, 8070. [https://doi.org/ 10.3390/app11178070](https://doi.org/10.3390/app11178070)

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. Eds. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 633p.

Saputra, F., Shiu, Y., Chen, Y., Puspitasari, A. W., Danata, R. H., Liu, C., Hu, S. (2016) Dietary supplementation with xylanase-expressing *B. amyloliquefaciens* R8 improves growth performance and enhances immunity against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 58, 397-405.

Seminario-Amez, M.; Lopez-Lopez, J.; Estrugo-Devesa, A.; Ayuso-Montero, R.; Jane-Salas, E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal*. 2017, 22, e282–e288.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*. 2008;14(7):582-90

Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83, 894–907.

Schmid, E., Eick, S., Sculean, A., & Salvi, G. E. (2021). Peri-Implant Diseases: Characteristics of the Microbiota and of the Host Response in Humans - A Narrative Review. *Monographs in oral science*, 29, 98–104. <https://doi.org/10.1159/000510186>

Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dörfer C, Paris S. Effects of heat-inactivated *Bifidobacterium* BB12 on cariogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro. *Arch Oral Biol* 2014; 59(12):1384-90.

Sivamaruthi, B.S.; Kesika, P.; Chaiyasut, C. A Review of the Role of Probiotic Supplementation in Dental Caries. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2020, 12, 1300–1309.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>

Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*

subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. International Dairy Journal 17, 1107–1114.

Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., Requena, T. (2009). *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. International Journal of Food Microbiology. 132, 109–116.

Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C., Kanatani, K., 1996b. Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1132. Applied and Environmental Microbiology 62, 892–897.

Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009;88(2):105-15.

Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. Clinical Periodontology 2013; 40(11):1025-35.

Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009;52:467–75.

Tuite-McDonnell M, Griffen AL, Moeschberger ML, Dalton RE, Fuerst PA, Leys EJ. Concordance of *Porphyromonas gingivalis* colonization in families. J Clin Microbiol 1997;35:455-461

Veiga, P.; Suez, J.; Derrien, M.; Elinav, E. Moving from probiotics to precision probiotics. Nat. Microbiol. 2020, 5, 878–880. [CrossRef]

Vestman NR, Timby N, Holgerson PL, Kressirer CA, Claesson R, Domellöf M, et al. Characterization and *in vitro* properties of oral lactobacilli in breastfed infants. BMC Microbiol. 2013;13:193.

Wenus, C., Goll, R., Loken, E.B., Biong, A.S., Halvorsen, D.S., Florholmen, J., 2008. Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. *European Journal of Clinical Nutrition* 62, 299–301.

Willis, J.R.; Gabaldon, T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms* 2020, 8, 308. [CrossRef] [PubMed] 2.