

Comportamiento de *Streptococcus mutans* bajo exposición prolongada a xilitol, sin recultivo.

Deysée Almarza-Ortega^{1,2}, María Esther Gómez², Alonso Del Villar³, Douglas Esparza³.

¹Facultad Experimental de Ciencias, ²Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo 4001-A, ³Centro de Computación y Unidad de Estadística, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras claves: Xilitol, *Streptococcus mutans*, crecimiento, fermentación.

Resumen: Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que *Streptococcus mutans*, bacteria oral cariogénica, no metaboliza xilitol -polialcohol considerado anticariogénico- aún después de un período de 10 meses de exposición al poliol, durante el cual la bacteria fue transferida mensualmente a medio fresco. Dado el riesgo potencial de adaptación, común en las bacterias, se estudió el comportamiento de *Streptococcus mutans* (Cepa 1161, Ingbritt) expuesto al poliol durante 7 meses, sin transferencias a nuevo medio. Las células bacterianas se mantuvieron en tripti-casa soya (TS), sin glucosa, al cual se le adicionó xilitol (0,25 g/100 ml) y en el mismo medio sin carbohidrato. Después de 7 meses, las células fueron transferidas mensualmente a medio fresco hasta completar 14 meses. El control estuvo representado por células de *Streptococcus mutans* cultivadas en TS con glucosa (0,25 g/100 ml). El crecimiento bacteriano en presencia de xilitol fue 63-78% más bajo que el observado en el control. Este mismo patrón se encontró en los cultivos que no contenían carbohidrato. El pH del medio durante el crecimiento se mantuvo por encima de 6,00, tanto en los cultivos que contenían xilitol como en aquellos que no contenían carbohidrato, mientras que en el control el pH final fue muy bajo ($4,69 \pm 0,12$). Las células bacterianas transferidas a TS con glucosa, exhibieron un patrón de crecimiento equivalente al observado en el control. Ningún cultivo fermentó xilitol; el pH del medio de fermentación permaneció alrededor de 6,00. No se observó consumo de ¹⁴C(U)- xilitol y la actividad de la enzima xilitol dehidrogenasa no pudo ser detectada con los procedimientos experimentales usados.

El presente trabajo ratificó que *Streptococcus mutans* no tiene habilidad para metabolizar xilitol, aún después de periodos prolongados de exposición al azúcar-alcohol. Asimismo, demostró que el xilitol puede ser considerado una sustancia inerte para las células de *Streptococcus mutans*, las cuales se mantuvieron viables durante 14 meses en presencia del polioli, comportamiento equivalente al observado cuando el medio de cultivo no contenía carbohidrato.

Recibido: 23-03-94. Aceptado: 27-05-94.

INTRODUCCION

Streptococcus mutans es una especie bacteriana de placa dental humana, vinculada con la etiología de la caries dental, por su capacidad para producir ácido a partir de carbohidratos de bajo peso molecular y sintetizar poliglucanos de sacarosa. En virtud de ello, en odontología se ha intentado sustituir la sacarosa de la dieta por azúcares menos cariogénicos. Uno de los endulzantes propuestos es el xilitol, un pentitol cuyo poder edulcorante y calórico es similar a la sacarosa.

Evidencias de varios laboratorios indican que el xilitol disminuye la incidencia de caries dental en animales de experimentación (11, 21, 22, 27) y en humanos (24, 25, 26). Estos hallazgos han conducido a diversos laboratorios a la búsqueda de una explicación al efecto preventivo del xilitol. Desde el punto de vista microbiológico, se ha sugerido que el xilitol ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias cariogénicas (13, 14, 15, 23, 29). Makinen (15) demostró que el xilitol inhibió el crecimiento de

Streptococcus mutans (Cepa Ingbritt), pero reportó crecimiento normal después de 4-5 meses de exposición continua a xilitol. En estudios posteriores (13, 14) encontraron un retardo en el crecimiento de la misma cepa expuesta a xilitol por periodos prolongados, comparado con el crecimiento en glucosa. Vadeboncoeur y col. (29) reportaron inhibición en el crecimiento de 9 cepas de *Streptococcus mutans*, debido a la presencia de xilitol. Assev y col. (3, 4) y Rolla y col. (23) también observaron el mismo efecto en las cepas OMZ 176 y GS5 de *Streptococcus mutans*, respectivamente. En concordancia con esta inhibición en el crecimiento bacteriano, Assev y col. (5) y Knuuttila y col. (13) reportaron pHs elevados en el medio de crecimiento, asociado a la presencia de xilitol.

En relación a la capacidad bacteriana para adaptarse a metabolizar xilitol, nuestro laboratorio ha reportado que la exposición de *Streptococcus mutans* a xilitol durante 10 meses con transferencias mensuales a medio fresco, no indujo la síntesis de las enzimas neces-

rias para el transporte del poliol o su metabolización (1).

Dado el riesgo potencial de adaptación que existe en la bacterias, el presente estudio se llevó a cabo con el objeto de confirmar esos hallazgos y determinar el comportamiento bacteriano por la exposición al azúcar alcohol, sin transferencias mensuales a medio fresco, durante 7 meses.

MATERIAL Y METODOS

Cepa y su cultivo

La cepa de *Streptococcus mutans* (SS No. 1161, Ingbritt) fue aislada originalmente de placa dental humana y proporcionada a este laboratorio por el Dr. Richard Facklman (Department of Health and Human Services, Atlanta-Georgia). La bacteria se mantuvo a 5 °C en cultivos sembrados por estria, que contenían Tripticasa soya (1,7 g/100 ml) y agar (2 g/100 ml), con transferencias mensuales a medio nuevo. El mismo medio, sin agar, se usó para hacer los subcultivos. Mensualmente, se realizó la caracterización bioquímica de la cepa, a través de la fermentación de manitol y sorbitol (0,5 g/100 ml) en el medio Tioglicolato sin carbohidrato e indicador (24 g/L) con caldo de base púrpura (16 g/L). La pureza de la cepa se comprobó mediante la morfología de las colonias en el medio Agar Mitis Salivarius (90 g/L) con Telurito de Potasio (1 ml/L) y tinción de Gram.

Las células de *Streptococcus mutans* se transfirieron a un medio de cultivo que contenía tripticasa (1,7 g/100 ml), soya (0,3 g/100 ml), K_2HPO_4 (0,25 g/100 ml), NaCl (0,5 g/100 ml) y agar (2 g/100 ml). La misma composición, sin agar, se usó en el medio líquido. Este medio base se dividió en dos grupos (I-II). El medio I contenía xilitol (0,25 g/100 ml), el medio II no contenía carbohidrato. El medio base se esterilizó durante 15 min. a 110 °C; el xilitol se preparó por separado, se esterilizó por filtración (Membranas Millipore; 0,45 μ m) y se adicionó al medio base estéril. Las células se mantuvieron en estos medios durante 7 meses, sin transferencias mensuales a medio fresco. Luego del lapso bajo estas condiciones, se inició la transferencia mensual de las bacterias a medio fresco durante 7 meses más. El volumen del inóculo fue el 10% del volumen final del medio de crecimiento. El control estuvo representado por células de *Streptococcus mutans* creciendo en el medio Tripticasa soya que contenía glucosa (0,25 g/100 ml). Todos los cultivos se realizaron en condiciones aeróbicas (sin agitación), a 37°C.

Reactivos

Los medios de cultivo usados y la solución de telurito de potasio fueron obtenidos de Difco (Detroit, MI, USA). El xilitol y la glucosa se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). El manitol y el sorbitol fueron de Merck (Darmstadt, Alemania). El fosfato dipotási-

co fue de Fisher Scientific Co. (Fair Lawn, NY, USA). El xilitol radioactivo ($^{14}\text{C}(\text{U})$ -Xilitol) fue obtenido de Radiochemical Centre, Amersham, England.

Crecimiento celular y determinación de pH

Diez ml de los cultivos I, II y Control, con 18 horas de incubación, se inocularon en 100 ml del medio correspondiente y se incubaron a 37°C . El crecimiento celular se determinó siguiendo la turbidez de los cultivos en un espectrofotómetro (Gilford 2400-2), a 650 nm, para lo cual se utilizaron alícuotas de 3 ml a la hora 0 y a cada hora hasta completar 9 horas, y una final se tomó a las 24 horas. Asimismo, se tomaron alícuotas correspondientes a cada periodo indicado para determinar el pH del medio de cultivo durante el crecimiento (Research pH meter, Beckman Instruments).

Fermentación de azúcares

La capacidad fermentativa para varios azúcares, se determinó en medio base Tioglicolato, sin carbohidrato e indicador (24 g/L) con caldo de base púrpura (16 g/L). Este medio se dividió en seis grupos (1-6). El medio 1 contenía xilitol (0,25 g/100 ml); el medio 2, xilitol (0,125 g/100 ml) más glucosa (0,125 g/100 ml); el medio 3, glucosa (0,25 g/100 ml); el medio 4, manitol (0,25 g/100 ml); el medio 5, sorbitol (0,25 g/100 ml) y el medio 6 no contenía ningún carbohidrato. El medio base se esterilizó durante

15 min. a 110°C . Los azúcares se prepararon por separado, se esterilizaron por filtración (Membranas Millipore, 0,45 μm) y se adicionaron al medio base estéril. Para las pruebas, 5 ml de cada uno de estos medios fueron inoculados con 0,5 ml de cultivos de 18 horas, procedentes de los grupos descritos (I, II) y se incubaron durante 7 días, según la técnica descrita por Edwarsoon (7). Diariamente se registraron los cambios ocurridos en los cultivos. El día 7 se determinó el pH a cada uno de ellos. Se consideró fermentación positiva un pH menor o igual a 5,5; como fermentación positiva débil, un pH de 5,6 a 5,9 y fermentación negativa, un pH mayor o igual a 6,0 (7).

Consumo de $^{14}\text{C}(\text{U})$ -Xilitol

Las células de *Streptococcus mutans*, provenientes de los cultivos descritos se usaron para determinar el consumo de xilitol radioactivo, usando una modificación de la técnica descrita por Knuuttila y Mäkinen (14). Para este propósito, se adicionaron 10 μl (2 μCi) de $^{14}\text{C}(\text{U})$ -xilitol (Actividad Específica 76 mCi/mmol) a 3 ml de los cultivos, previamente sedimentados en Centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B (17000 g, rotor SS-34, 30 min., 4°C) y lavados con buffer Tris (0,01 M, pH 8,2). El tiempo de incubación en xilitol radioactivo fue de 4 horas a 37°C . El blanco estuvo representado por 3 ml de buffer con 10 μl del azúcar radioactivo.

Transcurrido el periodo indicado, se tomaron alícuotas de 0,5 ml y se

filtraron (Membranas Millipore, 0,45 μ m). Los filtros se lavaron dos veces con 0,5 ml de buffer Tris, se colocaron en viales con 10 ml de Aquasol-2 (New England Nuclear) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo (1215 Rack Beta LKB Wallac).

Determinación de la actividad de la enzima xilitol dehidrogenasa

Una alícuota de 60 ml de los cultivos descritos, con 18 horas de incubación se centrifugaron (1200 g, rotor SS-34, 4°C, 15 min.; centrifuga Sorvall Superspeed RC2-B), se suspendieron en 2 ml de buffer fosfato frío (0,05 M, pH 7,2) y se homogenizaron (Homogenizador Celular Braun). La actividad de la enzima xilitol dehidrogenasa se determinó siguiendo la técnica descrita por Touster y Montesi (28) y la descrita por Gerlach (8) para determinar la enzima sorbitol dehidrogenasa, usando xilosa como sustrato en este último caso.

Métodos estadísticos

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico S.A.S. y se aplicó la técnica de Análisis de Varianza, usando el Modelo Lineal General (G.L.M.) del S.A.S. Las pruebas de media se realizaron mediante el método de Medias Mínimas Cuadráticas (L.S.M).

RESULTADOS

Crecimiento y pH

La Fig. 1 representa el crecimiento de las células de *Streptococcus mutans*, incubadas en un medio que contenía xilitol como fuente de carbono, durante diferentes períodos de exposición al polirol, comparado con el control. Los valores de densidad óptica al final de la fase exponencial de los cultivos con xilitol fueron inferiores (63-78%) a las lecturas obtenidas en el control. El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre las curvas de crecimiento de estos dos tratamientos en cada uno de los períodos estudiados.

El patrón de crecimiento de las células expuestas a xilitol, fue equivalente al observado en las células cultivadas en un medio carente de carbohidrato, no encontrándose diferencias entre las curvas de crecimiento correspondientes a estos cultivos.

Por otro lado, no se observó una modificación evidente en el patrón de crecimiento de los cultivos que habían permanecido durante 7 meses sin transferencias a medio fresco (Fig. 1a), cuando se comparó con el crecimiento correspondiente a aquellos cultivos cuyos medios habían sido renovados a partir del séptimo mes (Fig. 1b,c).

El comportamiento observado durante el crecimiento bacteriano en presencia de xilitol, se correspondió con altos valores de pH alcanzados por los cultivos (Fig. 1a, b,

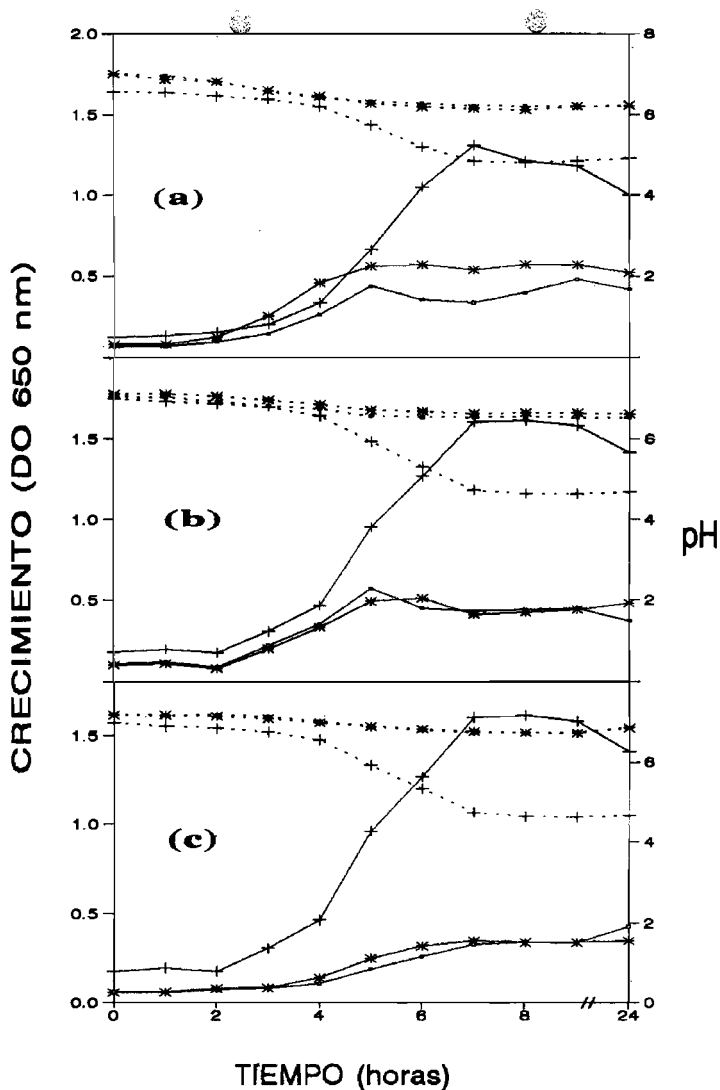


Fig. 1. Crecimiento de *Streptococcus mutans* (líneas sólidas) y pH del medio de crecimiento (líneas punteadas) después de su exposición en un medio que contenía 0,25% xilitol (□), el medio sin carbohidrato (*) y el control con 0,25% glucosa (+). Las células se mantuvieron en xilitol o en el medio sin carbohidrato durante 7 meses sin transferencia a medio fresco (a), luego fueron transferidas mensualmente a medio fresco hasta completar 10 meses (b) y 14 meses (c). Cada punto en las curvas representa la media de 3 ó 4 experimentos; la desviación estandar (no indicada) fue insignificante.

c). En aquellos donde el xilitol constituyó la fuente de energía, el pH se mantuvo por encima de 6,0, situación equivalente a la observada en los cultivos cuyo medio no contenía carbohidrato. En el control, el pH final fue de $4,69 \pm 0,12$, encontrándose diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre el pH final correspondiente a los cultivos con xilitol y sin carbohidrato, con respecto al obtenido por el control.

Cuando las células de *Streptococcus mutans* que habían estado expuestas a xilitol durante 7 meses sin cambios a medio fresco, se transfirieron a uno que contenía glucosa ($0,25 \text{ g}/100\text{ml}$) se produjo una recuperación en el crecimiento bacteriano, el cual alcanzó niveles comparables con el control. En concordancia con ésto, la presencia de la glucosa provocó una caída del pH ($4,72 \pm 0,12$) en el medio de crecimiento, similar a la observada en el control (Fig. 2).

Fermentación de azúcares

Las células procedentes de los cultivos expuestos a xilitol o al medio sin carbohidratos durante 7, 10 y 14 meses, fueron usadas para estudiar su capacidad para fermentar xilitol, una mezcla de xilitol y glucosa, glucosa, manitol, sorbitol y el medio sin carbohidrato. Los resultados, presentados en la Fig. 3a,b, permiten ilustrar dos bloques; uno, el superior, considerado como carbohidratos no fermentables; y otro, el inferior, de azúcares fermentables. En el primer grupo, el pH alcanzado por el medio de fermentación

el 7^o día de incubación estuvo alrededor de 6,0, y correspondió a los cultivos que contenían xilitol ($\text{pH } 6,16 \pm 0,13$) y aquellos cuyo medio no contenía carbohidrato ($\text{pH } 6,03 \pm 0,37$). En el segundo grupo se encuentran los azúcares fermentables, en el siguiente orden: glucosa ($\text{pH } 4,33 \pm 0,21$), manitol ($\text{pH } 4,64 \pm 0,26$), sorbitol ($\text{pH } 4,66 \pm 0,47$) y xilitol- glucosa ($\text{pH } 4,86 \pm 0,55$). En correspondencia con estos resultados, durante los registros diarios de cambio de color no se observó modificación del medio de fermentación que contenía xilitol o en aquel que no contenía carbohidrato, confirmándose la ausencia de fermentación.

Consumo de $^{14}\text{C(U)}$ -xilitol

El número de cpm registradas en los filtros durante los experimentos de incorporación de xilitol radioactivo, fueron bajas por lo que se consideraron externas a la muestra (background). No se produjeron cambios detectables en ninguno de los cultivos durante los 14 meses de período adaptativo, aún en aquellos con exposición continua a xilitol.

Actividad de la enzima xilitol dehidrogenasa

Durante los 14 meses de estudio no se detectó actividad de la enzima xilitol dehidrogenasa en los cultivos, ni la capacidad de las células para inducir su síntesis después del período adaptativo.

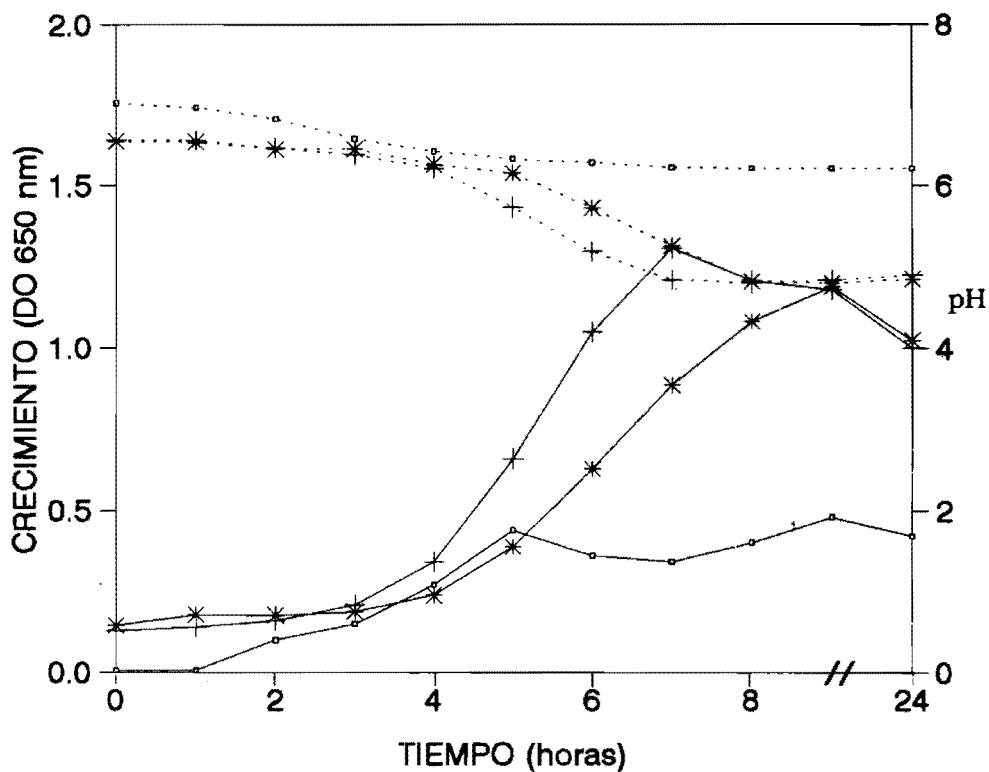


Fig. 2. Crecimiento de *Streptococcus mutans* (líneas sólidas) y pH del medio de crecimiento (líneas punteadas) expuesto a 0,25% xilitol durante 7 meses (□) y después transferido a 0,25% glucosa (*), comparados con el control (+). Cada punto en las curvas representa la media de 3 ó 4 experimentos; la desviación estandar (no indicada) fue insignificante.

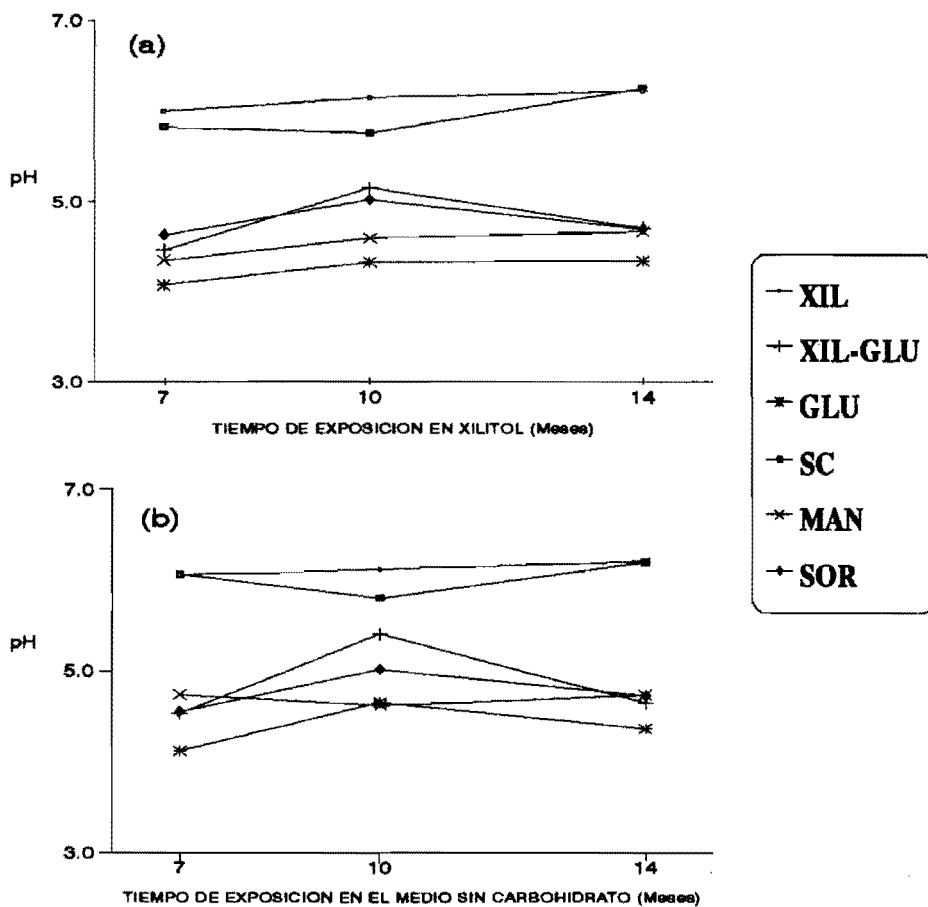


Fig. 3. pHs alcanzados por subcultivos de *Streptococcus mutans* durante la fermentación de azúcares en diferentes períodos de exposición a xilitol (a) o al medio sin carbohidrato (b). Los azúcares probados fueron Xil= Xilitol; Xil-Glu= Xilitol-Glucosa; Glu=Glucosa; Man= Manitol; Sor= Sorbitol. SC corresponde al medio sin carbohidrato.

DISCUSION

La evaluación bacteriológica de los azúcares sustitutos de la sacarosa, exige baja fermentabilidad de los mismos por las bacterias acidógenas de la placa dental. En tal sentido, se hace necesario estudiar la producción de ácidos por cultivos bacterianos puros expuestos al azúcar sustituto, determinar el metabolismo del azúcar por las bacterias, analizar su efecto sobre el crecimiento bacteriano y evaluar la capacidad de adaptación microbiana para fermentarlo.

Basado en las anteriores consideraciones, se estudió el comportamiento de *Streptococcus mutans* durante su exposición prolongada a xilitol. El análisis de los resultados demostró que una concentración de 0,25% xilitol disminuyó el crecimiento de *Streptococcus mutans*, comparado con el control, tanto en los cultivos expuestos a xilitol sin transferencia a medio fresco (7 meses), como en aquellos cuyo medio fue renovado mensualmente (10 y 14 meses), revelando la incapacidad bacteriana para adaptarse a usar el poliol como fuente de carbono. Dado que las bacterias se mantuvieron viables tanto en xilitol como en el medio sin carbohidrato durante el período de adaptación, se asumió el metabolismo de otra fuente de energía, tales como proteínas del medio, según ha sugerido Knuuttila y col. (13,14). Estos autores encontraron un retardo en el crecimiento de *Streptococcus mu-*

tans durante su exposición prolongada en xilitol y no observaron adaptación bacteriana para metabolizar el poliol, pero obtuvieron evidencias de adaptación para metabolizar otros compuestos como aminoácidos y péptidos (13). Así, postularon que el mantenimiento prolongado de las células en presencia de xilitol pudo inducirles a usar péptidos y/o aminoácidos en forma más efectiva, lo que se evidenció por un aumento en la actividad de peptidasas extracelulares (14).

Considerando que el largo período de exposición bacteriana al poliol podía ocasionar modificaciones intracelulares, en este trabajo se evaluó la funcionabilidad de las células transfiriéndolas a un medio de cultivo suplementado con glucosa, después de 7 meses sin renovación del mismo. El análisis de los resultados reveló una recuperación en el crecimiento celular, indicando que la bacteria conservó su integridad metabólica, por lo menos en lo que respecta al transporte y metabolismo de la glucosa.

El comportamiento del microorganismo durante su crecimiento en xilitol observado en el presente estudio, se correspondió con altos valores de pH final detectado en los cultivos. Esto indicó que la bacteria no fue capaz de convertir xilitol a ácido ni de adaptarse a hacerlo, ya que tal comportamiento permaneció inalterable durante todo el período de exposición al poliol. Estas observaciones son consistentes con los reportes de otros laboratorios (4, 13, 15, 29) sobre la producción

de ácido por parte de bacterias de la cavidad bucal, a partir de xilitol o una mezcla de este poliol con otros azúcares. Este efecto también ha sido observado en mezclas de microorganismos de placa dental humana, incubados en un medio que contenía xilitol, cuyo pH final estuvo entre 6,1 y 6,3 (10) y en muestras de placa dental humana incubadas en una solución de saliva y xilitol, en las cuales el pH se mantuvo entre 7,5 y 8,2 (12).

En el presente trabajo, la mejor evidencia de la incapacidad de *Streptococcus mutans* para producir ácido de xilitol se obtuvo en las pruebas de fermentación, en las cuales el pH del medio que contenía xilitol se mantuvo por encima de 6,00, similar al observado en el no suplementado con carbohidrato. Ninguno de los cultivos expuestos durante 14 meses a xilitol, utilizó el poliol, pero fermentaron glucosa, manitol, sorbitol y xilitol-glucosa. Estos resultados están acordes con previos estudios realizados por Almarza-Ortega y col. (2), Ghering y col. (9) y Edwarsoon y col. (7). Estos últimos encontraron que -a excepción de *L. Salivarius subsp. salivarius* (ATCC 11741)- otras cepas orales de estreptococo o lactobacilo fueron incapaces de fermentar xilitol. Asimismo, Makinen y col. (19) no encontraron adaptación ni mutación microbiana para la descomposición acidogénica de xilitol, durante el curso de sus estudios por períodos prolongados. Se ha sugerido (20), que la molécula de xilitol es demasiado pequeña para unirse

a los sitios activos de las enzimas microbianas, lo que hace del poliol un pobre sustrato para tales enzimas.

Estudios previos (1) demostraron la incapacidad de *Streptococcus mutans* para incorporar xilitol radioactivo y la ausencia de actividad de la enzima xilitol dehidrogenasa, requerida para la metabolización del azúcar-alcohol. Los resultados obtenidos en la presente investigación confirman estos hallazgos y demuestran que la bacteria no es capaz de incorporar xilitol radioactivo. Probablemente se debe a la carencia de las enzimas necesarias para su transporte a través de la pared celular o a la incapacidad de inducir la síntesis de la enzima xilitol dehidrogenasa, aún después de un período adaptativo. Esto es consistente con Knuuttila y col. (14) y Drucker y col. (6), quienes encontraron que el consumo de xilitol marcado, por células de *Streptococcus mutans*, fue insignificante. Resultados similares han sido reportados en placa dental humana (17, 18). En relación a la enzima xilitol dehidrogenasa, Makinen (15) encontró que su actividad fue casi nula en un estreptococo cariogénico estudiado. En placa dental humana (16, 17) y en la saliva total (16), se ha reportado que -después de dos años de consumo de xilitol- la actividad enzimática fue muy baja, variable y, en muchos sujetos, prácticamente nula.

Los resultados de este estudio permiten concluir que el xilitol constituye una sustancia inerte

para *Streptococcus mutans*. La disminución en el crecimiento observada en los cultivos que contenían xilitol, se produjo por la carencia de un carbohidrato fermentable en el medio, y no por efecto inhibitorio del xilitol, lo que se evidenció por una disminución equivalente en el crecimiento de los cultivos cuyo medio no estaba suplementado con carbohidratos. Asimismo, se concluye que *Streptococcus mutans* no metaboliza xilitol y esta propiedad no se modifica por períodos prolongados de exposición al mismo. La bacteria no tiene habilidad para incorporar el azúcar-alcohol y la enzima xilitol dehidrogenasa no es constitutiva de la bacteria, la cual es incapaz de inducir su síntesis aún después de una larga exposición al poliól.

AGRADECIMIENTO

Nuestro reconocimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, por el apoyo financiero otorgado para la realización de esta investigación.

ABSTRACT

Behavior of *Streptococcus mutans* by prolonged exposition to xylitol, without recultures. Almarza-Ortega, D. (Facultad Experimental de Ciencias-Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Clínicas, Universidad del Zulia, Apartado Postal 1151, Maracaibo

4001-A, Venezuela), Gómez, M.E., Del Villar, A., Esparza, D. *Invest Clin* 35(2): 77 - 90, 1994.

Key Words: Xylitol, *Streptococcus mutans*, growth, fermentation.

Previous studies carried out in our laboratory showed that *Streptococcus mutans* -a cariogenic oral bacteria- did not metabolize an anticariogenic sugar alcohol, xylitol, even after a 10-month adaptative period with monthly transfers to a fresh medium. Due to the potential risk to adaptation observed in bacterias, it was studied the behavior of *Streptococcus mutans* (Strain 1161, Ingbritt) exposed to the polyol during 7 months, without monthly transfers to a new medium. After 7 months the cells were monthly transferred to a fresh medium for 7 more months. The cells were maintained and grown in a Trypticase-soytone-base medium without dextrose which contained xylitol (0.25 g/100mL) or no sugar added. The control was represented by cells of *Streptococcus mutans* growing in Trypticase-soytone-base medium containing dextrose (0.25 g/100 mL). The growth pattern in the presence of xylitol was similar to that obtained in the cultures without sugar added, but it was 63-78% lower when compared with the control. The final pH in the cultures with xylitol was around 6.0; in the control it was very low (4.69 ± 0.12). When the cells maintained in xylitol were transferred to the medium containing dextrose, the growth pattern was similar to that of the control.

Any cultures fermented xylitol; the pH of the fermentation medium remained around 6.00 when the xylitol was present. No uptake of ^{14}C -xylitol was observed and the activity of the enzyme xylitol dehydrogenase could not be detected with the experimental procedure used. The present study confirmed the *Streptococcus mutans* inability to metabolize xylitol, even after a prolonged adaptative period in the sugar alcohol. Moreover, it demonstrated that xylitol could be considered an inert substance to *Streptococcus mutans* since the cells were viable in the presence of the xylitol, or in the medium without sugar added.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ALMARZA-ORTEGA D.: Growth and Metabolism of *Streptococcus mutans* in the presence of xylitol. (Abstract). FASEB Journal 6(1):A 173, 1992.
- 2- ALMARZA-ORTEGA D.; GOMEZ M.E., CASANOVA A.: Fermentación de xilitol por *Streptococcus mutans*. (Resumen). Acta Cient Ven 43(Supl. 1):31, 1992.
- 3- ASSEV S., VEGARUD G., ROLLA G.: Brief report. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* strain OMZ 176 by xylitol. Acta Path Microbiol Scand. Sect B 88:61-63, 1980.
- 4- ASSEV S; WALER SM; ROLLA G.: Further studies on the growth inhibition of some oral bacteria by xylitol. Acta Path Microbiol Immunol Scand. Sect B. 91:261-265, 1983.
- 5- ASSEV S., ROLLA G.: Sorbitol increases the growth inhibition of xylitol on *Streptococcus mutans* OMZ 176. Acta Path Microbiol Immunol Scand. Sect B. 94:231-237, 1986.
- 6- DRUCKER D.B., VERRAN J.: Uptake of xylitol, sorbitol and sucrose by streptococci (Abstract). J Dent Res (Special issue D). 56:117, 1977.
- 7- EDWARSOON S., BIRKHED D., MEJARE B.: Acid production from lycasin, maltitol, sorbitol and xylitol by oral streptococci and lactobacilli. Acta Odont Scand 35:257-263, 1977.
- 8- GERLACH U.: Sorbitol dehydrogenase. In: Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1963 p 761.
- 9- GHERING F., MAKINEN K.K., SCHEININ A.: Turku sugar studies IV: An intermediate report on differentiation of polysaccharide-forming streptococci (*Streptococcus mutans*). Acta Odont Scand 33(Suppl. 70):57-66, 1975.
- 10- GRENBY T.H., PHILLIPS A., MISTRY M.: Studies of the dental properties of lactitol compared with five other bulk sweeteners in vitro. Caries Res 23:315-319, 1989.
- 11- GRUNBERG E., BESKID G., BRIN M.: Xylitol and dental caries: efficacy of xylitol in reducing dental caries in rats. Int J Vitam Nutr Res 43(Feb. Spec. issue): 227-232, 1973.
- 12- HAYES M.L., ROBERTS K.R.: The breakdown of glucose, xylitol and other sugar alcohols by human dental plaque bacteria. Archs Oral Biol 23:445-451, 1978.

- 13- KNUUTTILA M.L.E., MAKINEN K.K.: Effect of xylitol on the growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. Caries Res 9:177-189, 1975.
- 14- KNUUTTILA M.L.E., MAKINEN K.K.: Extracellular hydrolase activity of the cells of the oral bacterium *Streptococcus mutans* isolated from man and grown on glucose or xylitol. Archs Oral Biol 26:899-904, 1981.
- 15- MAKINEN K.K.: Enzymes dynamics of cariogenic streptococcus: The effect of xylitol and sorbitol. J Dent Res 51(1-3):403-408, 1972.
- 16- MAKINEN K.K., SCHEININ A.: Turku sugar studies VII: Principal biochemical finding on whole saliva and plaque. Acta Odont Scand. 33(Suppl. 70):129-171, 1975.
- 17- MAKINEN K.K., REKOLA M.: Xylitol binding in human dental plaque. J Dent Res 55 (5):900-904, 1976.
- 18- MAKINEN K.K.: Microbial growth and metabolism in plaque in the presence of sugar alcohols. In: Proc. Microbial Aspects of Dental Caries. Eds. H.M. Stiles, W.J. Loesche and T.C. O'Brian. Microbial Abstr 11(Special issue):521-538, 1976.
- 19- MAKINEN K.K., VIRTANEN K.K.: Effect of 4-5 year use of xylitol and sorbitol on plaque. J Dent Res 57:441-446, 1978.
- 20- MAKINEN K.K.: Xylitol and oral health. Adv Food Res 25:137-158, 1979.
- 21- MUHLEMANN H.R., REGOLATIB., MARTHALER T.M.: The effect on rat fissures caries of xylitol and sorbitol. Helv Odont Acta 14:48-50, 1970.
- 22- NAVIA J.M., LOPEZ H., FISHER J.S.: Caries promoting properties of sucrose substitutes in foods: mannitol, xylitol and sorbitol. J Dent Res 53(Feb. Spec. issue):207, 1974.
- 23- ROLLA G., OPPERMAN R.V., WAALER S.M., ASSEV S.: Effect of aqueous solutions of sorbitol-xylitol on plaque metabolism and on growth of *Streptococcus mutans*. J Dent Res 89:247-250, 1981.
- 24- SCHEININ A., MAKINEN K., YLITALO K.: Turku sugar studies I: An intermediate report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. Acta Odont Scand 32:383-412, 1974.
- 25- SCHEININ A., MAKINEN K.K.: Turku sugar studies I-XX. Acta Odont Scand 33(Suppl.70):5-348, 1975.
- 26- SCHEININ A., MAKINEN K., YLITALO K.: Turku sugar studies V: Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. Acta Odont Scand 33(Suppl. 70):67-104, 1975.
- 27- STEPHAN R.M.: Effect of different types of human foods on dental health in experimental animals. J Dent Res 15:1551-1561, 1966.
- 28- TOUSTER O., MONTESI G.: Xylitol dehydrogenase. Methods in enzymology (V). Edit. by Sidney P. Calowick and Nathan O. Kaplan. New York and London. Academic press. 1962, pp 317-322.
- 29- VADEBONCOEUR C., TRAHAN L., MOUTON C., MAYRAND D.: Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. J Dent Res 62(8):882-884, 1983.