

Utjecaj odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline na dentalne patogene

Sušac, Mislav

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:471484>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Biotehnologija

Mislav Sušac

7588/BT

**Utjecaj odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline na dentalne
patogene**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: Prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline na dentalne patogene
Mislav Sušac, 0058212738

Sažetak:

Prevenција i zaštita od različitih dentooralnih oboljenja važan je čimbenik s direktnim utjecajem na kvalitetu života. Nažalost, unatoč konstantnim naporima u Republici Hrvatskoj trend kvalitete dentooralnog zdravlja je negativan te je pojavnost srodnih oboljenja u porastu. Navednom problemu se pristupa liječenjem, ali i sustavnom prevencijom koja je navedena kao jedan od ciljeva nacionalnog programa za preventivu i zaštitu oralnog zdravlja. U pristupu navedenim problemima ističe se pravilna higijena kako bi se smanjila pojavnost patogenih mikroorganizama, uzročnika dentooralnih oboljenja. Novija istraživanja ukazuju na djelotvornost probiotičkih pripravaka u prevenciji i redukciji spomenutih oboljenja. Cilj ovoga rada bilo je kvantificirati sposobnost formiranja biofilmova odabranih patogena uzročnika dentooralnih oboljenja i odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline, potencijanih probiotika te odrediti antimikrobni utjecaj istraživanih bakterija mliječne kiseline na patogene mikroorganizme. Svi testirani patogeni umjereni su do jaki producenti biofilma, dok je osam od devet bakterija mliječne kiseline također klasificirano kao jaki producenti biofilma. Većina potencijalnih probiotičkih bakterija pokazala je značajnu antimikrobnu aktivnost prema testiranim patogenima.

Ključne riječi: antimikrobno, biofilm, dentalni patogeni, probiotici

Rad sadrži: 25 stranica, 9 slika, 6 tablica, 48 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: Deni Kostelac, mag. ing.

Datum obrane: 1.rujan 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Influence of selected strains of lactic acid bacteria on dental pathogens
Mislav Sušac, 0058212738

Abstract: Prevention and protection against various dental and oral diseases is an important factor with a direct impact on quality of life. Unfortunately, despite constant efforts in the Republic of Croatia, the trend in the quality of dental health is negative and the incidence of related diseases is increasing. This problem is approached through treatment, but also systemic prevention, which is listed as one of the goals of the national program for prevention and protection of oral health. In the approach to these problems, proper hygiene is emphasized in order to reduce the occurrence of pathogenic microorganisms, the most common causes of dental and oral diseases. Recent research indicates the effectiveness of probiotic preparations in the prevention and reduction of these diseases. The aim of this study was to quantify the ability to form biofilms of selected pathogens of dental and oral diseases and selected strains of lactic acid bacteria, potential probiotics, and to determine the antimicrobial effect of the studied lactic acid bacteria on pathogenic microorganisms. All pathogens tested were moderate to strong biofilm producers, while eight of the nine lactic acid bacteria were also classified as strong biofilm producers. Most potential probiotic bacteria showed significant antimicrobial activity against the tested pathogens.

Keywords: antimicrobial, biofilm, dental pathogens, probiotics

Thesis contains: 25 pages, 9 figures, 6 tables, 48 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Frece

Technical support and assistance: Deni Kostelac, MSc

Defence date: September 1th 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Biofilmovi	2
2.2 Dentalni biofilmovi	3
2.3 Probiotici	4
2.4 Antimikrobno djelovanje probiotika	5
2.5 Mikroorganizmi uzročnici dentooralnih oboljenja	6
2.5.1 <i>Streptococcus mutans</i>	6
2.5.2 <i>Streptococcus sanguinis</i>	7
2.5.3 <i>Streptococcus intermedius</i>	8
2.5.4 <i>Candida albicans</i>	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1 Materijali	9
3.1.1 Mikroorganizmi	9
3.1.2 Hranjive podloge	10
3.1.3 Popis aparature i pribora	11
3.1.4 Kemikalije	11
3.2 Metode rada	12
3.2.1 Kvantifikacija sposobnosti formiranja	12
3.2.1.1 Uzgoj mikroorganizama	12
3.2.1.2 Postavljanje eksperimenta na mikrotitarskim pločicama	12
3.2.1.3 Statistička obrada dobivenih podataka	12
3.2.2 Određivanje antimikrobne aktivnosti odabranih sojeva BMK na dentalne patogene	14
3.2.2.1 Uzgoj mikroorganizama	14
3.2.2.2 Turbidimetrijsko određivanje antimikrobne aktivnosti	14
3.2.2.3 Statistička obrada dobivenih podataka	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1 Kvantifikacija sposobnosti formiranja biofilma	15
4.2 Antimikrobna aktivnost odabranih sojeva BMK na uzročnike dentooralnih oboljenja	18
5. ZAKLJUČAK	21
6. LITERATURA	22

1. UVOD

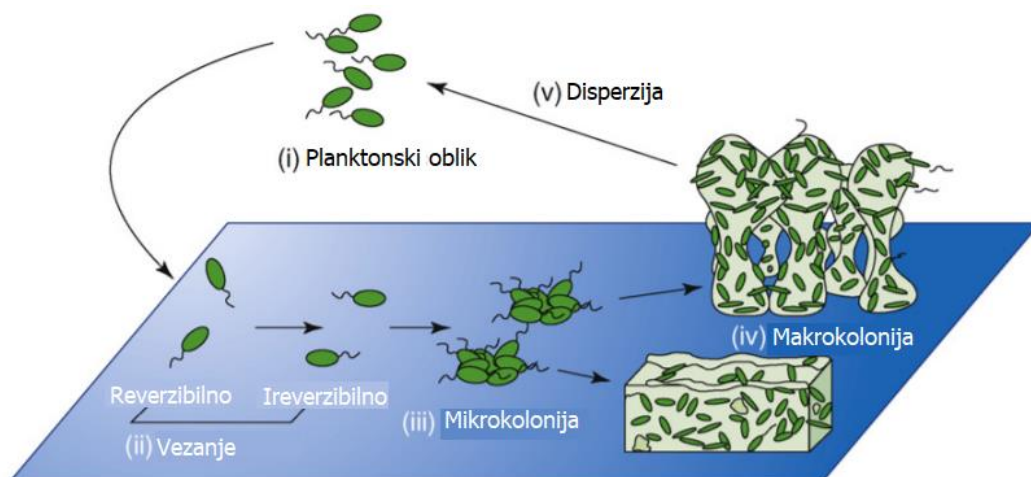
Jedne od najčešćih bakterijskih infekcija kod ljudi su dentalne infekcije, koje kao posljedicu često imaju pojavu propadanja zubi i periodontalna oboljenja. Prema Američkoj dentalnoj asocijaciji (eng. "American Dental Association") u Sjedinjenim Američkim Državama se 2016. godine potrošilo preko 120 milijardi dolara za potrebe liječenja dentalnih oboljenja. Liječenja su skupa jer započinju tek kad se pojave prvi simptomi, umjesto da se radi na prevenciji. U stomatološkoj struci prevladava mišljenje, da nakupljanje bakterija na površini zuba u obliku agregata, poznatijih pod nazivom dentalni plak, uzrokuje i kvarenje zubi i pojavu bolesti gingive (desni). To je dovelo do zaključka, da bi prevencija trebala biti usmjerena prema sprječavanju nastajanja tih nakupina ili ono što nazivamo bakterijskih biofilmova (Loesche, 1986).

Usna šupljina heterogeni je okoliš, kojeg karakterizira jako raznolika mikrobiota. S obzirom da se sastoji od velikog broja fizičkih dijelova (jezik, nepce, gornja i donja čeljust), koji se razlikuju ne samo po strukturi tkiva, već i po uvjetima koji pogoduju razvoju mikroorganizama, svaki dio usne šupljine potiče razvoj nekih drugih vrsta mikroorganizama. Površina usne šupljine je oko 200 cm², od čega 20 % zauzimaju zubi, a ostatak mukozno tkivo (Collins i Dawes, 1987). Raznolikost uvjeta i varijabilnost bioloških struktura u određenoj mjeri podupiru razvoj patogenih mikroorganizama. Kao dominantni patogeni dentooralnog sustava su bakterije roda *Streptococcus*, koje možemo podijeliti u 4 grupe i to prema biokemijskim i fiziološkim razlikama, ali i prema genetskoj pripadnosti. To su: mutans vrste (*S. mutans*), koji se vežu uz karijes i dentalni plak, zatim mitis vrste (*S. sanguis*), koji su prisutni u dentalnom plaku, salivarius vrste (*S. salivarius*), većinom se vezuju uz mukozna tkiva usne šupljine i vrste anginosus (*S. intermedius*), detektirane uglavnom u gingivalnim šupljinama (McBain i sur., 2009). Osim bakterija, neke vrste funga također mogu doprinijeti dentalnim oboljenjima. Jedna od njih je i *Candida albicans*, koja se najviše vezuje uz pojavu prostetskog stomatitisa, bolesti koja se javlja kod nositelja mobilnih prostetskih nadomjestaka (Lamfon i sur., 2003). Oportunistički je mikroorganizam te kod imunokompromitiranih osoba može uzrokovati lokalne i sistemske infekcije (Niimi i sur., 1999). Kako je u svijetu zabilježena sve veća pojava rezistencije mikroorganizama na antibiotike, liječenje to jest prevencija pojave dentalnih i periodontalnih bolesti je postala ključan dio stomatološke, ali i biotehnoške struke. Kako se sve veća značajnost pridaje probioticima i probiotičkim preparatima, cilj ovoga rada bio je ispitati kako odabrani sojevi bakterija mliječne kiseline utječu na rast i razvoj patogenih mikroorganizama te je ispitana njihova sposobnost formiranja biofilmova.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Biofilmovi

Biofilmovi su višestanične zajednice mikroorganizama, koje na okupu drži ekstracelularni matriks proizveden od samih mikroorganizama. Precizna struktura, sastav i fiziologija unutar biofilma ovise o prirodi mikroorganizama koji ga sačinjavaju, a sama vrsta ekstracelularnog matriksa pridonosi organizaciji unutar njega (Lopez i sur., 2010). Molekularni mehanizmi koji reguliraju formaciju biofilma variraju između različitih vrsta, čak i različitih sojeva iste vrste mikroorganizma. Međutim, neke su karakteristike prepoznate kao generalne i vrijede za sve vrste biofilma (Monds i O'Toole, 2009). Na primjer, svi biofilmovi sadrže ekstracelularni matriks, koji je većinom građen od polisaharida, zajedno s proteinima i molekulama DNA. Sama priroda matriksa egzopolisaharida ovisi o uvjetima uzgoja, mediju i supstratu na kojem se vrši uzgoj. Sposobnost proizvodnje ekstracelularnih polisaharida od strane bakterija dobro je poznata, s obzirom da ti polimeri uvelike doprinose mikrobnj virulenciji. Kako su neki od njih netopljivi u vodi, njihova detaljna i kvalitativna analiza je dugo bila otežana (Branda i sur., 2005). Dokazano je i da u strukturu matriksa pojedinog soja ne mora ulaziti samo jedan polisaharid, nego i više njih (Jiao i sur., 2010). Tako diferencijacija stanica u mikrobnim zajednicama ovisi o ekstracelularnim uvjetima. Formiranjem gradijenta nutrijenata, kisika i elektron akceptorskih molekula kroz strukturu biofilma stvara se mikrokoliš koji uvjetuje različito ponašanje pojedine stanice te njihovu različitu gensku ekspresiju (Spormann, 2008). Važna molekula uključena u rast i razvoj biofilma kao i za njegovu metaboličku aktivnost je kisik. Mogućnost difuzije kisika do unutrašnjih dijelova biofilma važna je za metaboličku aktivnost mikroorganizama u tom dijelu biofilma. Na primjeru modelnog organizma *Pseudomonas aeruginosa* dokazano je da kisik prodire samo do njegovog vanjskog dijela. Praćenjem aktivnosti kisik-ovisne alkalne fosfataze kroz presjek, utvrđena je ovisnost prisutnosti kisika i udaljenosti od površine, gdje se količina kisika smanjuje s udaljenošću od površine. Navedeno uzrokuje da su 2/3 stanica biofilma metabolički inaktivne (Xu i sur., 1998). Obzirom da su mikrobne stanice jednostanični organizmi, za formiranje biofilma ključna je međustanična komunikacija koja se odvija putem signalnih molekula. Kako je jedna od uloga biofilma zaštita, indikativno je da će signal za njegovo stvaranje biti potaknut nekim vanjskim podražajem. Ako se govori o molekulama koje same stanice proizvode, nazivamo ih autoinduktorima. Nakupljeni u visokim koncentracijama, potiču kaskadu reakcija, koja dovodi do ekspresije gena koji sudjeluju u stvaranju strukturnih komponenti biofilma. Takav način regulacije naziva se quorum sensing (Camilli i Basler, 2006).



Slika 1. Shematski prikaz nastajanja biofilma (nastajanje biofilmova opisano je kroz nekoliko specifičnih koraka- (i) pokretne jedinice bakterija (ii) vežu se na prikladnu podlogu, pri čemu nastaju (iii) mikrokolonije iz kojih se razvijaju sustavi (iv) makrokolonija. Pojedini dijelovi makrokolonije se mogu odvojiti (v) (dispergirati) i stvoriti novu koloniju organiziranu u obliku biofilma. Faza vezanja može se podijeliti u dvije podfaze: „reverzibilnu“ i „ireverzibilnu“. „Reverzibilna“ faza je početna faza, jer se jedinice na početku vežu slabim silama za podlogu, da bi se vremenom vezale dovoljno čvrsto da to postane „ireverzibilno“.) (prilagođeno prema Monds i O’Toole, 2009)

2.2 Dentalni biofilmovi

Formiranje biofilma na potpuno čistim zubima započinje stvaranjem zubne opne. Opna je građena od proteina, koji se iz cijele usne šupljine adsorbiraju na površini zuba. Elektrostatske interakcije imaju važnu ulogu prilikom adsorpcije i stvaranja zubne proteinske opne. Molekule koje u tome sudjeluju su različiti fosfoproteini, statherin, histatin, visokomolekularni-glikoproteini, amilaze, lizozim i laktoferin (Jäsberg, 2017). Opna se na svježe opranim zubima stvori unutar 20 minuta (Vacca Smith i Bowen, 1999). Vežanje bakterija na zubnu opnu posredovano je ne-specifičnim (Van der Waals-ove i elektrostatske interakcije) i specifičnim (vezanje bakterija na specifični ligand) interakcijama. Mikroorganizmi prepoznaju specifične ligande na koje se vežu, kao primjer je vezanje nekih bakterija na α -amilazu, enzim koji je prisutan u usnoj šupljini. Također, prilikom formiranja biofilma, razlikujemo bakterije koje se vežu direktno na zub i one koje ulaze u strukturu biofilma posredno, vezanjem na ranije vezane bakterije. Bakterije roda *Actinomyces* i *Streptococcus* su među prvim bakterijama koje

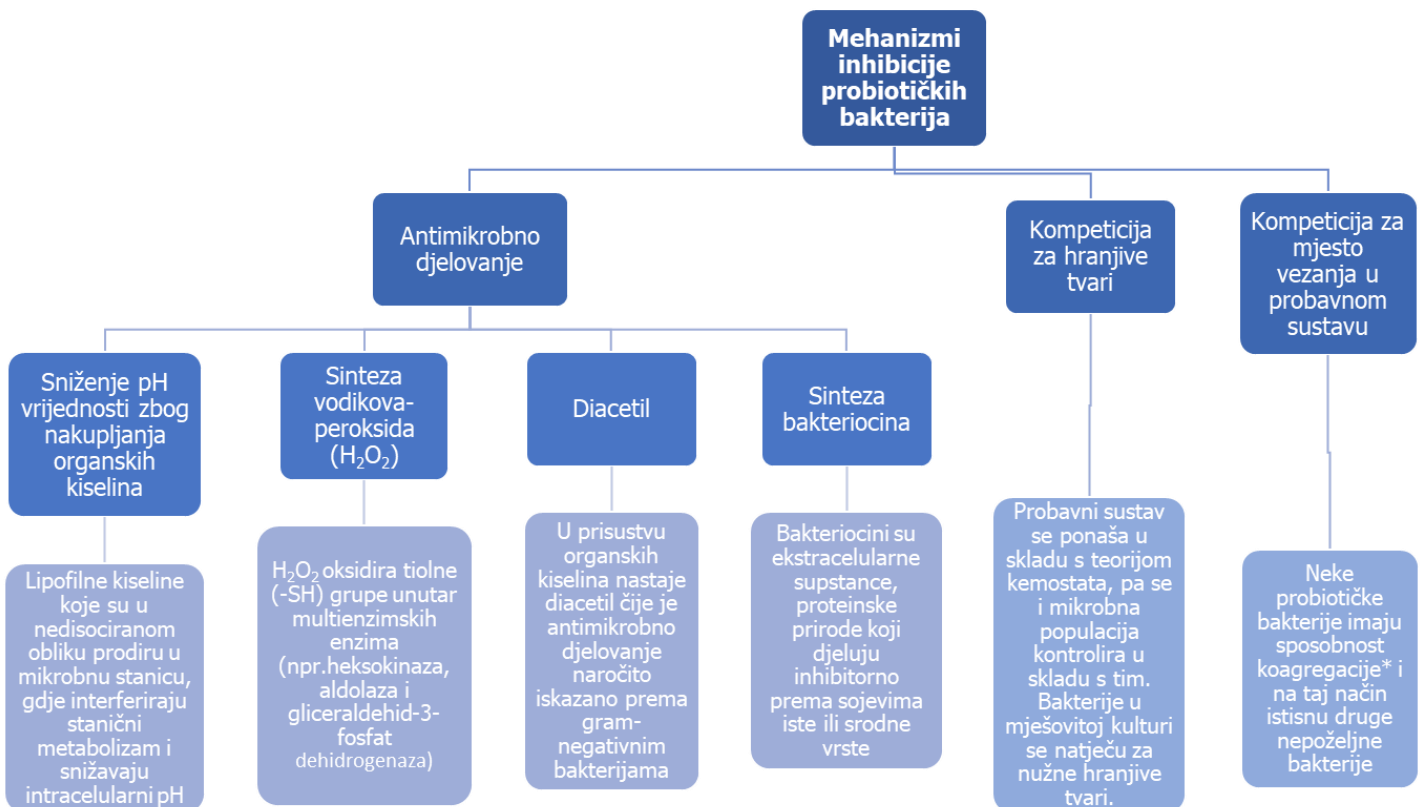
nastanjuju površinu zuba (Dige i sur., 2009). Koagregacija stanica bakterija započinje prilikom rasta biofilma. Vrste koje sudjeluju u daljnjoj izgradnji biofilma su većinom patogene. Neke od njih su i *Treponema* spp., *Porphyromonas gingivalis* te *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ove bakterije prepoznaju specifična vezna mjesta na prvotno vezanim bakterijama i tako se na njih vežu pomoću ugljikohidrata ili proteina te pomoću glikoproteina u slini (Li i sur., 2004).

2.3 Probiotici

Probiotici su jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primjenjene u ljudi ili životinja djeluju korisno na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković i sur., 1998). Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina bakterija koje se najčešće klasificiraju kao probiotici. Generalno se smatra da su BMK Gram-pozitivne i katalaza-negativne bakterije, nemaju citokroma, ne sintetiziraju porfirine, a rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama i nisu sporogene. Što se tiče potrebe za kisikom, rastu u mikro-aerofilnim do potpuno anaerobnih uvjeta. Kod mikro-aerofilnih vrsta prisutne su velike količine enzima NAD-oksidadze i NAD-peroksidaze koji omogućuju uklanjanje kisika iz međustaničnog prostora (Tripathi i Giri, 2014). Najvažniji rodovi BMK su: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* i *Bifidobacterium*. Svi ovi rodovi, s izuzetkom *Bifidobacterium*, spadaju u BMK s niskim G+C sastavom (<50%) (Klein i sur., 1998). Kao glavna karakteristika BMK je njihovo metaboličko svojstvo da šećere (heksoze) oksidiraju do mliječne kiseline. S obzirom koje šećere mogu fermentirati, dijelimo ih na homofermentativne (fermentiraju samo jednu vrstu šećera) i heterofermentativne (fermentiraju različite vrste šećera) (Drinan i sur., 1976). Djelotvornost pojedinog probiotika ovisi o soju, te se efikasnost pojedinog soja ne može pripisati nekom drugom, srodnom soju (Haukiojaa, 2019). Kao najvažniji kriterij u odabiru sojeva, koji bi se koristili u probiotičkim pripravcima, je njihova sposobnost adhezije i kolonizacije usne šupljine, te određeni mehanizam antimikrobnog djelovanja. Neki od mehanizama, kojim probiotici mogu djelovati antimikrobno su: proizvodnja vodikova peroksida, sinteza različitih vrsta bakteriocina, snižavanjem pH okoline ili sintezom određenih proteinaza (Sookkhee i sur., 2000). Pozitivni učinci na zdravlje pojedinih probiotički sojeva su dokazani, primjerice za sojeve *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) i *Bifidobacterium lactis* BB-12, koji su pokazali širok spektar djelovanja uključujući antimikrobna svojstva i imunomodulacijsku aktivnost. Od svih istraživanja koja se bave probioticima, većina se fokusira

na gastrointestinalni sustav, dok tek manji dio na oralno zdravlje (Alanzi i sur., 2017). Međutim, istraživanja u okviru korištenja probiotika u svrhu prevencije oralnih i dentalnih oboljenja pokazala su veliki potencijal i to posebice kod liječenja i prevencije karijesa, kandidijaza i halitoze (Matsubara i sur., 2016).

2.4 Antimikrobno djelovanje probiotika



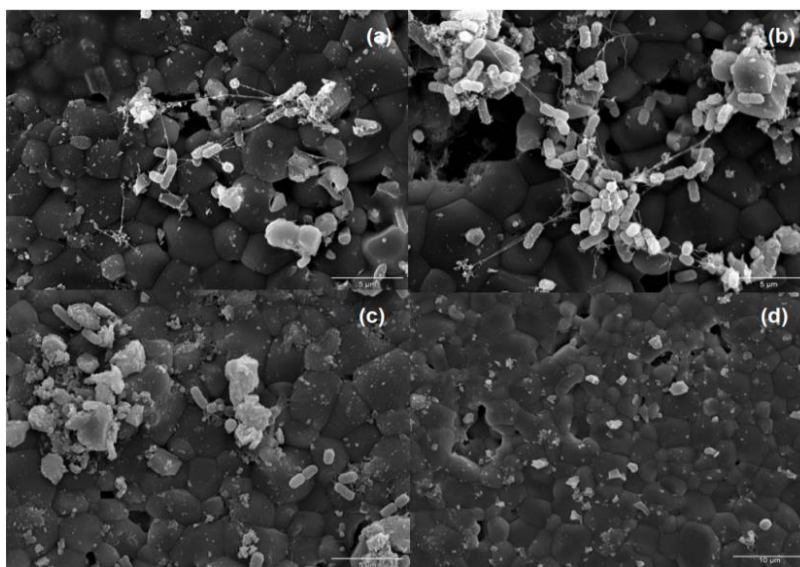
Slika 2. Mehanizmi probiotičke inhibicije rasta mikroorganizama (prilagođeno prema Šušković i sur., 1998.)

*koagregacija-proces u se kojem genetski različite bakterije povezuju u zajednicu pomoću specifičnih proteina

2.5 Mikroorganizmi uzročnici dentooralnih oboljenja

2.5.1 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans spada u skupinu anaerobnih, Gram-pozitivnih bakterija te dolazi u obliku koka. Posjeduje mogućnost fermentiranja manitola i sorbitola (Loesche, 1986). Među pojedinim sojevima postoji heterogenost i to prema serološkim i genetskim čimbenicima. Dokazano je postojanje čak 4 serološki različitih sojeva i to ovisno o ugljikohidratima koji grade antigene na površini stanične stijenke te 4 genetski različita soja određena metodama DNK hibridizacije (Coykendall, 1974). Primarno stanište u ljudima su usta, ždrijelo i crijeva. S obzirom da je veliki producent kiselina, *S. mutans* uvelike doprinosi etiologiji dentalnog plaka stvaranjem kiselog okruženja (Forsten i sur., 2010). Posebno je efikasan u formiranju biofilmova na tvrdom tkivu usne šupljine. U prisutnosti saharoze stvara ekstracelularne polisaharide (EPS-extracellular polysaccharide) koji doprionse stvaranju biofilmova i kariogenosti¹ *S. mutans*. Također, sintetizira nekoliko spojeva pomoću kojih se veže na zubnu opnu. Pomoću enzima glukozil-transferaza (GTF) stvara netopljive glukane i glukan-vezane proteine koji stabiliziraju strukturu biofilma. Određene proteine iz sline (npr. aglutinin) može ugrađivati u matriks biofilma (Ahu, 2008).

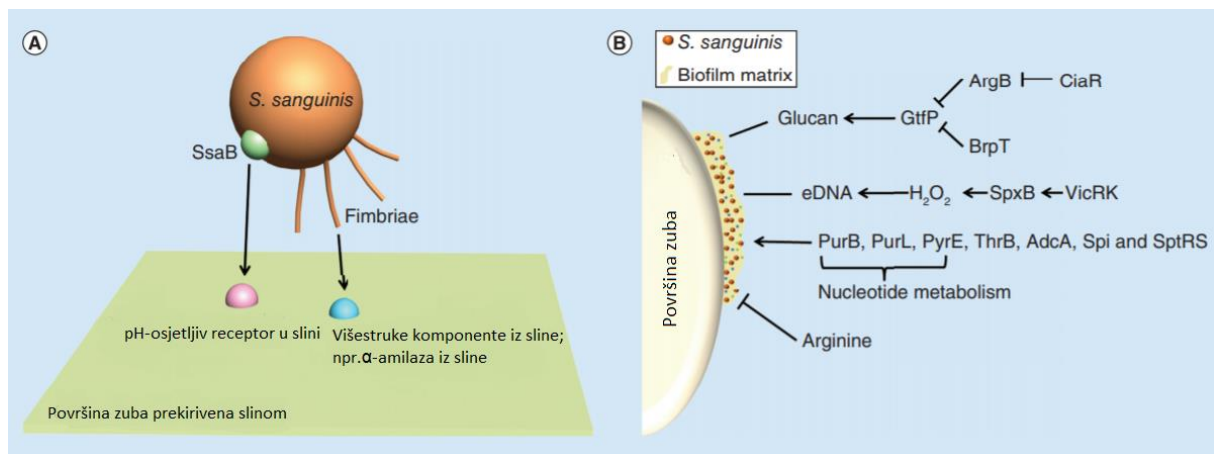


Slika 3. Vezanje *Streptococcus mutans* Ingbritt za hidroksiapatitne (HA) diskove, mikroskopirano SEM tehnikom ((a) umjetna slina, (b) umjetna slina koja sadrži 1% saharoze, (c) umjetna slina koja sadrži 1% saharoze i 4% ksilitola i (d) čista površina HA diska) (Forsten i sur., 2010).

¹Kariogenost-svojstvo bakterije da uzrokuje karijes i kvarenje zubi

2.5.2 *Streptococcus sanguinis*

Streptococcus sanguinis je Gram-pozitivna, fakultativno anaerobna i nesporogena bakterija. Na krvnom agru pokazuje specifičnu alfa-hemolizu, što je znak da može oksidirati hemoglobin u eritrocitima produkcijom vodikova-peroksida (H_2O_2). Nasljedni materijal je dvostruka, kružna molekula DNK. G+C sastav je oko 43 %, što je više nego kod drugih vrsta streptokoka. Unutar genoma kodiran je veliki broj površinskih proteina, koji omogućavaju lakšu kolonizaciju usne šupljine (Xiu, 2007). Posjeduje enzime potrebne za hidrolizu arginina i eskulina (olakšava detekciju i razlikovanje od drugih vrsta streptokoka), fermentaciju inulina te produkciju izvanstaničnih polisaharida (Frandsen i sur., 1991). *S. sanguinis* komenzalna je bakterija i doprinosi borbi s patogenima koji uzrokuju kvarenje zubi, međutim povezana je sa stvaranjem biofilмова i patogenim endokarditisom² te neutropenijom³ (Zhu i sur., 2018). Jedna je od prvih bakterija koja kolonizira usnu šupljinu (Scannapieco i sur., 1989). Samo vezanje bakterije za zubnu opnu posredovano je nepolarnim, hidrofobnim interakcijama (Nesbitt i sur., 1982).



Slika 4. Formiranje biofilma *S. sanguinis* na površini zuba (A) bakterija *S. sanguinis* prepoznaje receptore na površini zuba (roza i plava oznaka) stvara primarne veze i to pomoću fimbria i određenih specifičnih molekula na površini stanice (SsaB); (B) Metabolička kontrola ekspresije komponenti matriksa biofilma.) (Preuzeto i dorađeno prema Zhu i sur., 2018.)

² Endokarditis-bakterijska infekcija endokarda i srčanih zalistaka

³ Neutropenija-manjak neutrofila u krvi

2.5.3 *Streptococcus intermedius*

Streptococcus intermedius je Gram-pozitivna, nesporogena, nepokretna, aerotolerantno-anaerobna bakterija. Dio je normalne flore usne šupljine, gornjeg dijela respiratornog sustava, ženskog urogenitalnog sustava te gastrointestinalnog sustava (Whiley i Beighton, 1991). Uz *Streptococcus constellatus* i *Streptococcus anginosus* pripada u tzv. *Streptococcus milleri* skupinu (SMG-eng. „Streptococcus milleri group“), te ih je vrlo često teško međusobno razlikovati. Povezana je s tvorbom apscesa⁴ puno češće nego ostale dvije vrste, što pridonosi lakšoj detekciji (Claridge i sur., 2001). Stvara biofilme na površini zuba i to posredovano površinskim proteinom I/II (Ag I/II) (Pecharki i sur., 2005).

2.5.4 *Candida albicans*

Candida albicans je kvasac, dio normalnog ljudskog mikrobioma. Oportunistički je patogen koji većinu vremena provodi kao komenzalni organizam i ne uzrokuje patološka stanja. Kod imunokompromitiranih ljudi može uzrokovati infekcije. Dva su tipa infekcija: površinska infekcija (oralna i vaginalna kandidijaza) i sistemske infekcije, koje mogu biti opasne po život. Vrste iz roda *Candida*, s naglaskom na *Candida albicans*, prisutne su u 75 % populacije (Mayer i sur., 2013). *Candida albicans* veže se na nativni i denaturirani kolagen. Producira aspartil-proteazu te u kiselom mediju može razgraditi kolagen. Dokazana je i korelacija između prisutnosti *C. albicans* i pojave karijesa, što se pripisuje činjenici da je producent organskih kiselina. Posjeduje veliki broj ATPaza koje joj omogućavaju visoku toleranciju na kiselinu (Yang i sur., 2012). Genetskim metodama (prvenstveno PCR-a) dokazano je postojanje 5 genetski različitih sojeva, od kojih se samo 3 vezuju uz dentalna oboljenja. Oportunistički je mikroorganizam, te parazitira gotovo sve dijelove tijela, duboka tkiva, organe, kožu, nokte, sluznicu kao i biomaterijale koji se koriste kao proteze, implantati, stentovi itd. Kolonizacija započinje adhezijom na površini mjesta koje parazitira. Za to su potrebni glikoproteini koji su prisutni svugdje u tijelu. Biofilmovi *C. albicans* pokazuju određene sličnosti s bakterijskim biofilmovima, kao što su strukturna heterogenost, prisutnost egzopolimera kao komponenti matriksa biofilma te smanjena osjetljivost na antifungalne antibiotike. Dimorfni je fung, što znači da može prijeći iz stadija kvasca u obliku plijesni (Ramage i sur., 2001).

⁴ Apsces-nakupina gnoja koja obično nastaje uslijed bakterijske infekcije

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Mikroorganizmi

Prilikom izrade ovog rada korištene su tri patogene bakterijske vrste te jedan kvasac. Kao probiotičke bakterije korišteno je devet izabranih sojeva BMK. Korišteni mikroorganizmi pohranjeni su u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Korišteni mikroorganizmi navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Korišteni mikroorganizmi prilikom izrade rada

Patogeni mikroorganizmi
<i>Streptococcus mutans</i> DSM 20523
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068
<i>Streptococcus intermedius</i> DSM 20573
<i>Candida albicans</i> 8
Bakterije mliječne kiseline (BMK)
<i>Lactobacillus plantarum</i> M2
<i>Lactobacillus plantarum</i> KO9
<i>Lactobacillus plantarum</i> K1
<i>Lactobacillus plantarum</i> S1
<i>Lactobacillus paracasei</i> DSM 4905
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 20021
<i>Lactobacillus plantarum</i> M1
<i>Lactobacillus plantarum</i> KO4

3.1.2 Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija mliječne kiseline korišten je MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) bujon, za uzgoj patogenih streptokoka M17 bujon te za uzgoj kvasca *Candida albicans* sladni bujon. Sastav hranjivih podloga nalazi se u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Sastav MRS i M17 hranjive podloge

MRS bujon*	koncentracija (g/L)	M17 bujon**	koncentracija (g/L)
Pepton	10,0	Pepton iz kazeina	2,5
Goveđi ekstrakt	10,0	Pepton	2,5
Ekstrakt kvasca	5,0	Sojin pepton	2,5
Glukoza	20,0	Kvašćev ekstrakt	5,0
Dinatrijev hidrogenfosfat	2,0	Goveđi ekstrakt	5,0
Natrijev acetat	5,0	Natrijev glicerofosfat	19,0
Amonijev citrat	2,0	Magnezijev sulfat	0,25
Magnezijev sulfat	0,2	Askorbinska kiselina	0,5
Manganov sulfat	0,05	Laktoza	5,0
Tween 80	1,0		

*MRS podloga-pripremljena na pH=6,5; sterilizacija na 121°C kroz 15min.

**M17 podloga-pripremljena na pH=7,1; sterilizacija na 121°C kroz 15 min.

Tablica 3. Sastav sladnog bujona

Sladni bujon***	koncentracija (g/L)
Sladni ekstrakt	6,0
Maltoza	1,8
Glukoza	6,0
Kvašćev ekstrakt	1,2

***Sladni bujon-pripremljen na pH=4,7; sterilizacija na 121°C kroz 15 min

3.1.3 Popis aparature i pribora

- Pipetman 10 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Pipetman 20 μ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Pipete od 10 ml (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Polistirenske mikrotitarske pločice (24 i 96 bunarčića) (Deltalab, Barcelona, Španjolska)
- Spektrofotometar (Helios β UV-Vis Unicam, Cambridge, UK)
- Čitač mikrotitarskih pločica (Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- Centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)

3.1.4 Kemikalije

- Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- Kristal violet (1%) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- MRS bujon (De man, Rogosa i Sharpe) (Biolife, Milan, Italy)
- M17 bujon (Biolife, Milan, Italy)
- Sladni bujon (Biolife, Milan, Italy)

3.2 Metode rada

3.2.1 Kvantifikacija sposobnosti formiranja

3.2.1.1 Uzgoj mikroorganizama

Korišteni mikroorganizmi uzgajani su prekoćno (24 h) u prethodno navedenim hranjivim podlogama na temperaturi od 37 °C za bakterije i na 28 °C za kvasac.

3.2.1.2 Postavljanje eksperimenta na mikrotitarskim pločicama

U svaku jažicu mikrotitarske ploče (24 bunarića) dodano je po 2 ml hranjive podloge (u jažice gdje su uzgajane BMK dodana je MRS hranjiva podloga, jažice gdje su uzgajani streptokoki M17 podloga, a u jažice gdje je uzgajana *Candida albicans* sladna podloga). Zatim se iz epruveta sa prethodno uzgojenim bakterijama otpipetiralo 100 µL suspenzije poraslih kultura i prebacilo u pripadajuću hranjivu podlogu. Za svaku hranjivu podlogu postavila se kontrola i to na način da se u jažicu dodala hranjiva podloga, ali ne i suspenzija mikroorganizama. Pločice s naciijepljenim mikroorganizmima inkubirale su se 48 h na temperaturi od 37 °C (bakterije) te na 28 °C (*Candida albicans*). Svaki uzorak rađen je u tri paralele.

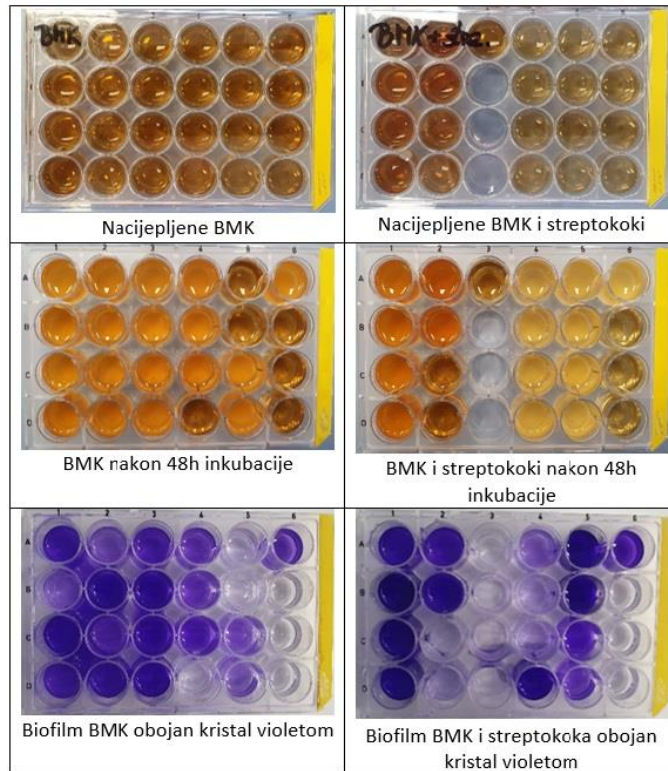
Nakon 48 h uklonjen je supernatant, a talog ispran s 2 ml sterilne vode uz blago miješanje. Preostale stanice (biofilm) fiksirane su dodatkom 2 ml metanola, koji je nakon 15 minuta uklonjen. Nakon što su se jažice osušile od zaostalog metanola, dodano je 2 ml 33% octene kiseline radi otpuštanja fiksiranog dijela boje i stanica. Sadržaj u jažicama je homogeniziran i prebačen u kivete te se spektrofotometrijski odredila apsorbancija pri 595 nm. Kao slijepa proba koristila se 33 % octena kiselina.

3.2.1.3 Statistička obrada dobivenih podataka

S obzirom da su rađene 3 paralele za svaki uzorak, izračunala se aritmetička sredina (1) za svaki uzorak te im se oduzela aritmetička sredina kontrole. Za svaki uzorak izračunala se i standardna devijacija prema dolje navedenom izrazu (2).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=0}^n x_i}{n} \quad (1)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$



Slika 5. Fotografije mikrotitarskih pločica pri kvantifikaciji biofilma (Prvi red pokazuje kako su pločice izgledale nakon što se pokus postavio, drugi red kako su izgledale nakon 48 h i treći red nakon što su pločice obrađene kristal violetom).

3.2.2 Određivanje antimikrobne aktivnosti odabranih sojeva BMK na dentalne patogene

3.2.2.1 Uzgoj mikroorganizama

Odabrani sojevi BMK uzgajani su u prekonočnoj kulturi (24 h), a patogeni sojevi (*Streptococcus* i *Candida*) u periodu 2 dana (48 h) i to u pripadajućim tekućim hranjivim podlogama.

3.2.2.2 Turbidimetrijsko određivanje antimikrobne aktivnosti

Nakon prekonočnog uzgoja BMK, porasle u hranjivoj podlozi, prebacimo u kivete za centrifugu i centrifugom 15 minuta na 6000 min^{-1} (Hermle) da odvojimo supernatant od stanica u talogu. Izdvojeni supernatant se sterilizira kroz $0,22 \mu\text{m}$ filtere. Mikrotitarske ploče se postavljaju tako da se u jažicu sa uzorkom doda $200 \mu\text{l}$ medija za uzgoj patogena, $40 \mu\text{l}$ supernatanta BMK i $10 \mu\text{l}$ suspenzije patogena. U jažice koje su predviđene za kontrolu, dodaje se $200 \mu\text{l}$ medija za uzgoj patogena, $40 \mu\text{l}$ sterilne MRS hranjive podloge i $10 \mu\text{l}$ suspenzije patogena. Slijepa proba sastoji se od $200 \mu\text{l}$ medija za uzgoj patogena, $40 \mu\text{l}$ supernatanta BMK i $10 \mu\text{l}$ sterilne vode. Mikrotitarske ploče su se inkubirale pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Eksperiment je za svaki uzorak proveden u triplikatu. Uzorcima se tijekom inkubacije mjerila aporbancija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica i to u periodima 0 h, 2 h, 6 h, 8 h, 24 h, 30 h, 48 h i 55 h.

3.2.2.3 Statistička obrada dobivenih podataka

Kako su rađene 3 paralele za svaki uzorak, izračunala se aritmetička sredina (1) za svaki uzorak te im se oduzela aritmetička sredina kontrole. Za svaki uzorak izračunala se i standardna devijacija prema prethodno navedenim izrazima (2).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu kvantificirana je *in vitro* sposobnost formacije biofilma odabranih dentalnih patogena te potencijalnih probiotičkih bakterija mliječne kiseline. Nadalje, određena je antimikrobna aktivnost supernatanta BMK na dentalne patogene s konačnim ciljem pronalaska potencijalnih probiotika koji mogu kompetitivno adhezirati i suzbijati rast uzročnika dentooralnih oboljenja te time iskazati potencijal u primjeni kao dentalni probiotici.

4.1 Kvantifikacija sposobnosti formiranja biofilma

Rezultati *in vitro* sposobnosti formacije biofilma dentalnih patogena prikazani su u Tablici 5. Svi testirani sojevi bakterija roda *Streptococcus* su klasificirani kao jaki producenti biofilma prema skali od Borges i sur., 2012 dok je *Candida albicans* klasificirana kao umjereni producent biofilma.

Tablica 4. Sposobnost formacije biofilma odabranih dentalnih patogena. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost trostrukog mjerenja $OD_{595} \pm$ standardna devijacija te klasifikacija u skupinu jačine sposobnosti formiranja biofilma (jaki producenti, umjereni producenti, slabi producenti te u nemogućnosti formirati biofilm) prema Borges i sur., 2012.

	<i>Streptococcus mutans</i> DSM 20523	<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	<i>Streptococcus intermedius</i> DSM 20573	<i>Candida albicans</i> 8
OD_{595}	1,732 \pm 0,008	1,504 \pm 0,250	0,504 \pm 0,188	0,289 \pm 0,032
OD_{595} (kontrola)	1,631 \pm 0,008	1,404 \pm 0,250	0,404 \pm 0,188	0,210 \pm 0,032
KLASIFIKACIJA	Jaki	Jaki	Jaki	Umjereni

Dobiveni rezultati ukazuju na snažnu sposobnost tvorbe biofilma testiranih sojeva roda *Streptococcus* nakon 48 h tretmana što je usporedivo s Borges i sur., 2012 koji su pokazali umjerenu do jaku sposobnost formacije biofilma streptokoka grupe B tijekom 48 sati tretmana u uvjetima neutralnog i blago kiselog pH kakvi su bili i u uvjetima eksperimenta ovoga rada. Očekivane vrijednosti i klasifikacija kao snažnih producenata biofilma za testirane sojeve u skladu su s dostupnom literaturom (Matsumoto-Nakano, 2018; Zhu i sur., 2018). Spomenuto ukazuje na značajnu opasnost nastajanja višeslojnih staničnih formacija koje mogu ugroziti dentooralno zdravlje čemu u prilog idu i istraživanja provedena u simuliranim uvjetima razvoja

dentalnog plaka. Tako Halib i sur., 2019 u simuliranim uvjetima koristeći prirodni zubni materijal demonstriraju veliki potencijal tvorbe biofilma *Streptococcus mutans* uz stimulaciju saharozom. Uz navedene opasnosti od strane patogenih bakterija roda *Streptococcus* javlja se opasnost i združenih biofilmova tih bakterija i gljivice *Candida albicans* (Koo i sur., 2018). Takve koinfekcije predstavljaju značajnu opasnost jer su direktno povezane sa stomatitisom, upalom oralne mukoze te su navedene kombinacije bakterije-fungi pronađene i u peridontalnim čvorovima i endodontskim kanalima (O'Donnell i sur., 2015).

Rezultati ovog rada potvrđuju navedene sposobnosti formacije biofilmova klasificirajući istraženi soj kao umjereni producent biofilma. Važna zapažanja izvedena su u istraživanju Uppuluri i sur. (2009) zaključujući kako *Candida albicans* u formaciji biofilma izražava značajno različita svojstva naspram planktonskog oblika što rezultira problematičnim uklanjanjem tako nastalih infekcija te naglašava važnost budućih istraživanja u kontekstu eliminacije takvih bioloških struktura i tretiranja infekcija. Posebice se ističu dentooralne infekcije jer prirodni mehanizmi obrane pomoću sastava i protoka sline nisu efikasni u spriječavanju formiranja biofilmova (McCall i sur., 2019).

Osim sposobnosti formacije biofilma patogenih uzročnika dentooralnih oboljenja, u ovom radu određena je i sposobnost formacije biofilma odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline. Rezultati su prikazani u tablicama 6 i 7.

Tablica 5. Sposobnost formacije biofilma odabranih bakterija mliječne kiseline. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost trostrukog mjerenja $OD_{595} \pm$ standardna devijacija te klasifikacija u skupinu jačine sposobnosti formiranja biofilma (jaki producenti, umjereni producenti, slabi producenti te u nemogućnosti formirati biofilm) prema Borges i sur., 2012.

	<i>Lactobacillus plantarum</i> M1	<i>Lactobacillus plantarum</i> KO4	<i>Lactobacillus paracasei</i> DSM 4905	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 20021
OD₅₉₅	1,739±0,003	1,732±0,010	1,341±0,192	0,194±0,028	1,031±0,218
OD₅₉₅ (kontrola)	1,547±0,003	1,541±0,010	1,250±0,192	0,104±0,028	0,941±0,218
KLASIFIKACIJA	Jaka	Jaka	Jaka	Slaba	Jaka

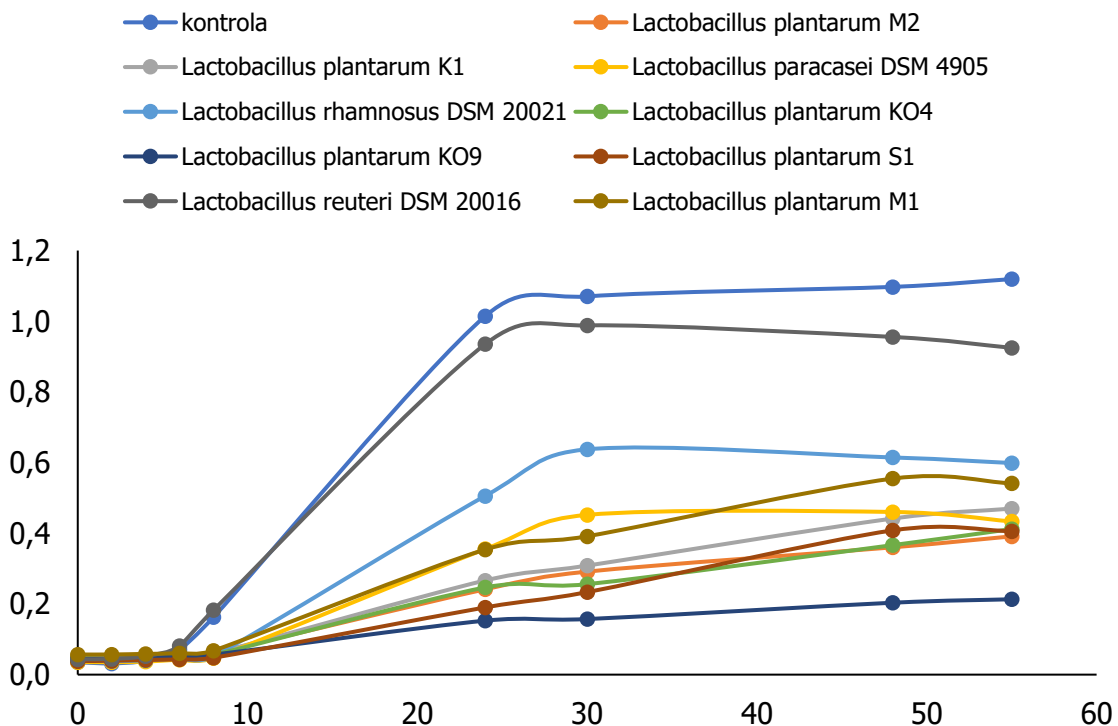
Tablica 6. Sposobnost formacije biofilma odabranih bakterija mliječne kisline. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost trostrukog mjerenja $OD_{595} \pm$ standardna devijacija te klasifikacija u skupinu jačine sposobnosti formiranja biofilma (jaki producenti, umjereni producenti, slabi producenti te u nemogućnosti formirati biofilm) prema Borges i sur., 2012.

	<i>Lactobacillus plantarum</i> M2	<i>Lactobacillus plantarum</i> KO9	<i>Lactobacillus plantarum</i> K1	<i>Lactobacillus plantarum</i> S1
OD₅₉₅	1,495±0,348	1,451±0,340	1,567±0,175	1,737±0,005
OD₅₉₅ (kontrola)	1,405±0,348	1,361±0,340	1,476±0,175	1,646±0,005
KLASIFIKACIJA	Jaka	Jaka	Jaka	Jaka

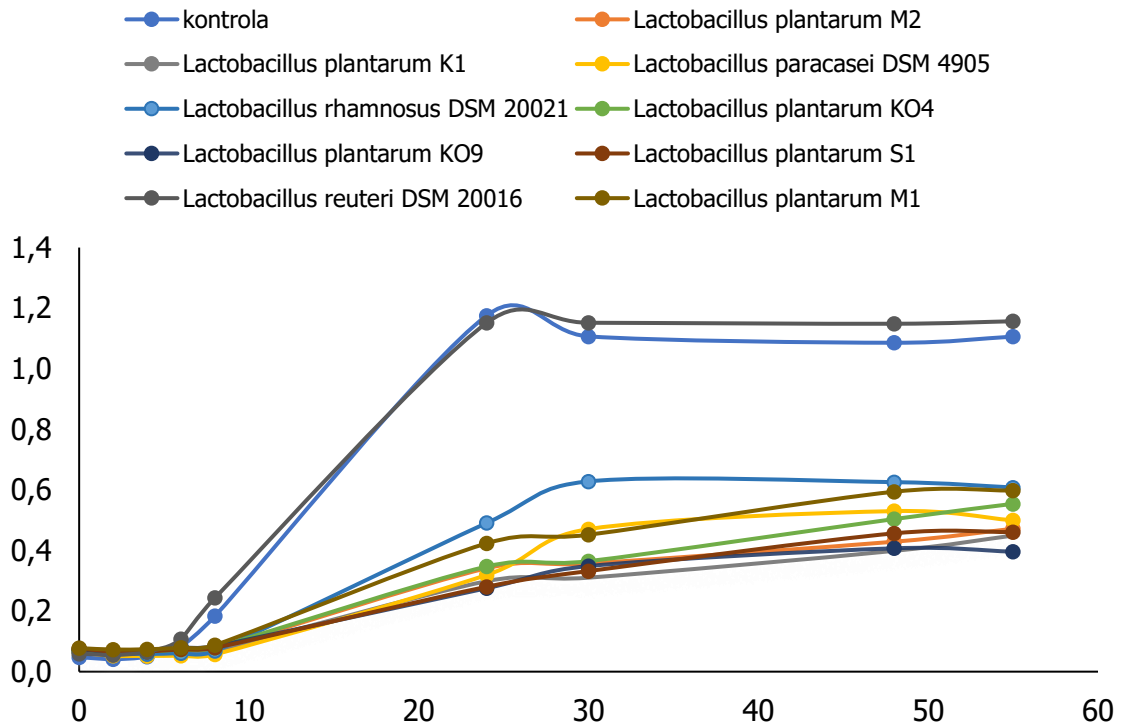
Formacija biofilma BMK jedan je od probiotičkih kriterija jer je povezana sa sposobnošću adhezije i kompeticije s patogenim mikroorganizmima. Osam od devet testiranih sojeva klasificirani su kao jaki producenti biofilma. Rajoka i sur. (2017) demonstrirali su slične rezultate za BMK sa izraženim probiotičkim potencijalom sojeva izoliranih iz humanog mlijeka. Sposobnost formacije snažnih biofilмова važna je pri prilagodbi na stresne uvjete okoliša i kolonizaciji različitih niša. Takva izražena sposobnost primjerice kod roda *Lactobacillus* smatra se vrlo korisnom jer produljuje vrijeme prisutnosti na sluznicama i onemogućava kolonizaciju patogenim bakterijama (Terraf i sur., 2012). Istraživanja probiotika u sprječavanju dentalnih kariogenih ishoda ukazuju na to da potencijal ovisi o istraživanom soju. Samo prodiranje i inhibicija nastanka u biofilmove *Streptococcus mutans* pokazano je kod *Lactobacillus rhamnosus* u istraživanju Lee i Kim, 2014.

4.2 Antimikrobna aktivnost odabranih sojeva BMK na uzročnike dentooralnih oboljenja

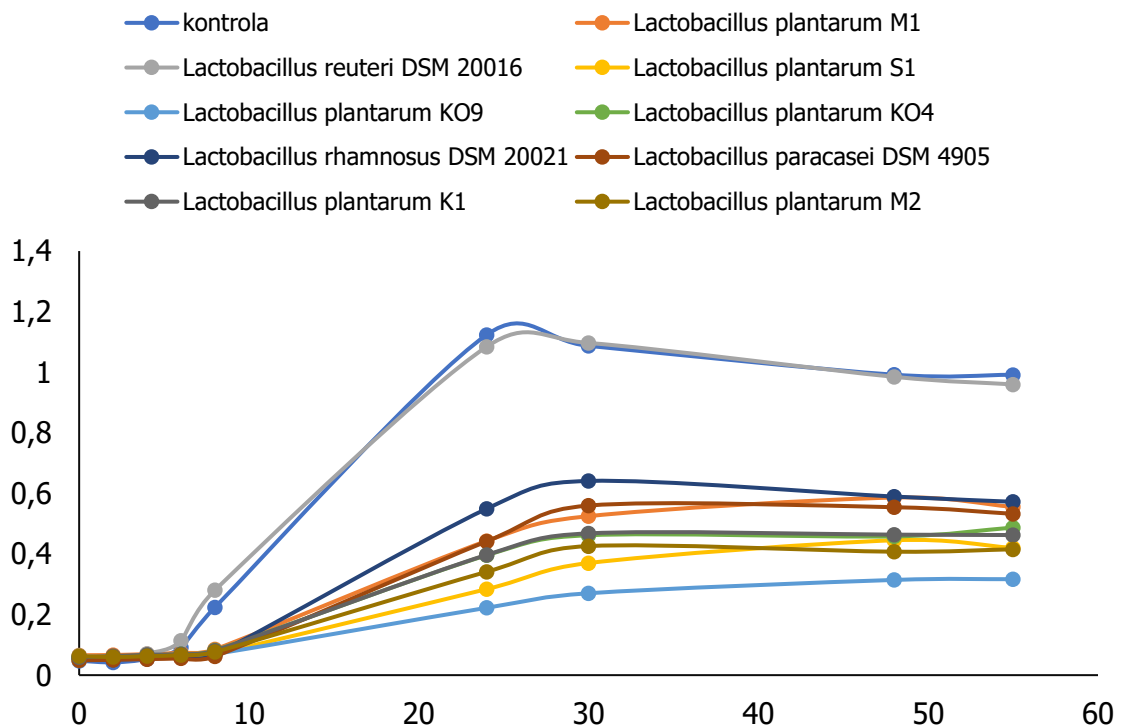
Osim mogućnosti tvorbe biofilмова i kompetitivnom zauzimanju ciljanih niša te tako onemogućujući formaciju složenih struktura patogenih mikroorganizama, prilikom razvijanja probiotičkih preparata nužna je i mogućnost inhibicije rasta izražena kao antimikrobna aktivnost. Antimikrobna aktivnost jedan je od nužnih probiotičkih kriterija stoga je kao dio ovog rada određen antimikrobni potencijal istraživanih sojeva BMK na dentalne patogene. Rezultati su prikazani na slikama 6 – 9.



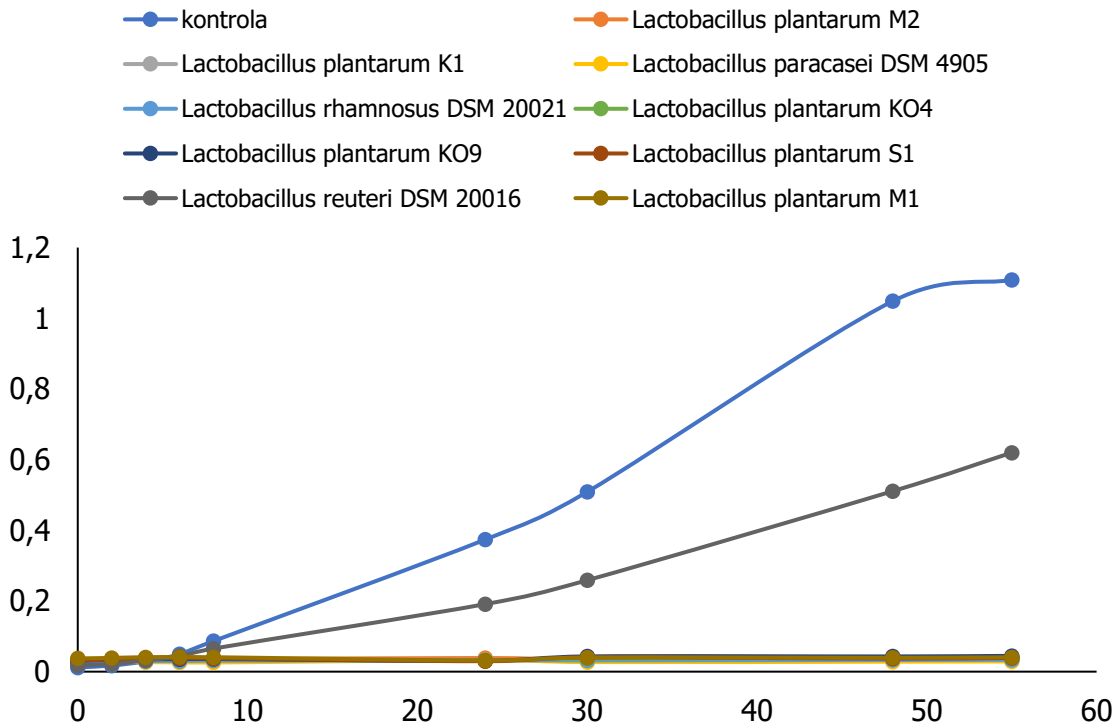
Slika 6. Krivulja rasta *Streptococcus intermedius* DSM 20573 u prisustvu supernatanta ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline. Rast je prikazan kao vrijednost optičke gustoće na 620nm u ovisnosti o vremenu (h).



Slika 7. Krivulje rasta *Streptococcus mutans* DSM 20523 u prisustvu supernatanta ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline. Rast je prikazan kao vrijednost optičke gustoće 620nm u ovisnosti o vremenu (h).



Slika 8. Krivulje rasta *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 u prisustvu supernatanta ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline. Rast je prikazan kao vrijednost optičke gustoće 620nm u ovisnosti o vremenu (h).



Slika 9. Krivulje rasta *Candida albicans* 8 u prisustvu supernatanta ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline. Rast je prikazan kao vrijednost optičke gustoće 620nm u ovisnosti o vremenu (h).

Testirani sojevi BMK pokazali su različite stupnjeve inhibicije patogenih mikroorganizama. Najmanju antimikrobnu aktivnost kod svih testiranih patogena iskazao je *Lactobacillus reuteri* dok su ostali sojevi značajno inhibirali patogene mikroorganizme. Važno je primjetiti kako je *L. reuteri* pokazao i najslabiju sposobnost formacije biofilma u testiranim uvjetima.

Maksimalnu inhibiciju pokazao je soj *Lactobacillus plantarum* KO9 inhibirajući patogene u visokom postotku (od 64,20 % do 95,97 %). Visoka sposobnost inhibicije patogenih mikroorganizama *L. plantarum* KO9 nije iznenađujuća obzirom da je taj soj u nedavnom istraživanju pokazao značajan probiotički potencijal i protuupalnu aktivnost u modelu upale patogenim mikroorganizmima (Kostelac i sur., 2020). U ovom radu mjerena je antimikrobna aktivnost supernatanta te literatura upućuje na nekoliko mehanizama djelovanja od sniženja pH, proizvodnje organskih kiselina do proizvodnje bakteriocina. Daljnje studije ovih sojeva su nužne kako bi se mehanistički objasnila dokazana antimikrobna aktivnost većine testiranih sojeva.

Iz dobivenih rezultata može se uvidjeti mogućnost korištenja BMK s probiotičkim potencijalom u suzbijanju uzročnika dentooralnih oboljenja. Daljnja istraživanja o mehanizmima djelovanja na patogene i tehnološkoj pripremi preparata koji bi se mogli koristiti kao dentalni probiotici su nužna kako bi se spomenuti potencijal maksimalno iskoristio.

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu određena je *in vitro* sposobnost formacije biofilma za odabrane dentooralne patogene: *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068, *Streptococcus intermedius* DSM 20573, *Candida albicans* 8. Svi istraženi mikroorganizmi klasificirani su kao umjereni do jaki producenti biofilma.
- U ovom radu određena je *in vitro* sposobnost formacije biofilma za devet odabranih bakterija mliječne kiseline. Svi istraženi mikroorganizmi klasificirani su kao jaki producenti biofilma uz iznimku *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 koji je klasificiran kao slab producent biofilma.
- Uspješno je određena antimikrobna aktivnost devet sojeva bakterija mliječne kiseline prema istraživanim dentalnim patogenima. Najveći stupanj inhibicije prema svim patogenim mikroorganizmima pokazao je *Lactobacillus plantarum* KO9 uz raspon inhibicije patogena od 65 do 95 %.
- *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 iskazao je najmanji potencijal inhibicije svih istraživanih patogenih mikroorganizama.

6. LITERATURA

1. Ahn, S. J., Ahn, S. J., Wen, Z. T., Brady, L. J., & Burne, R. A. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infection and immunity*, **76(9)**, 4259-4268.
2. Alanzi, A., Honkala, S., Honkala, E., Varghese, A., Tolvanen, M., & Söderling, E. (2018). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Beneficial Microbes*, **9(4)**, 593-602.
3. Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., Moeschberger, M. L., Kenyon, S. G., Galvin, J. L., Boches, S. K., Dewhirst, F. E., Griffen, A. L. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of clinical microbiology*, **40(3)**, 1001-1009.
4. Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, **13(1)**, 20-26.
5. Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, **9(7)**, 327-335.
6. Camilli, A., & Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, **311(5764)**, 1113-1116.
7. Clarridge III, J. E., Attorri, S., Musher, D. M., Hebert, J., & Dunbar, S. (2001). *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri group") are of different clinical importance and are not equally associated with abscess. *Clinical Infectious Diseases*, **32(10)**, 1511-1515.
8. Collins, L. M. C., & Dawes, C. (1987). The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *Journal of dental research*, **66(8)**, 1300-1302.
9. Coykendall, A. L. (1974). Four types of *Streptococcus mutans* based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics. *Microbiology*, **83(2)**, 327-338
10. Dige, I., Raarup, M. K., Nyengaard, J. R., Kilian, M., & Nyvad, B. (2009). *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology*, **155(7)**, 2116-2126.
11. Forssten, S. D., Björklund, M., & Ouwehand, A. C. (2010). *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients*, **2(3)**, 290-298.
12. Frandsen, E. V. G., Pedrazzoli, V., & Kilian, M. (1991). Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral microbiology and immunology*, **6(3)**, 129-133.

13. Halib, N., Rahman, N. Z. A., Hanafiah, R. M., Roslan, N., & Jauhar, N. (2019). A simplified system for simulation of *Streptococcus mutans* biofilm on healthy extracted human tooth as dental plaque model. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **9(02)**, 112-115.
14. Hamada, S., & Slade, H. D. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews*, **44(2)**, 331.
15. Haukioja, A. (2010). Probiotics and oral health. *European journal of dentistry*, **4(3)**, 348.
16. Holt, S. C., Kesavalu, L., Walker, S., & Genco, C. A. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, **20(1)**, 168-238.
17. Jäsberg, H. (2017). Probiotic bifidobacteria and lactobacilli in oral health-interactions with biofilms and the host.
18. Jiao, Y., Cody, G. D., Harding, A. K., Wilmes, P., Schrenk, M., Wheeler, K. E., ... & Thelen, M. P. (2010). Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms. *Applied and environmental microbiology*, **76(9)**, 2916-2922.
19. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, **41(2)**, 103-125.
20. Koo, H., Andes, D. R., & Krysan, D. J. (2018). *Candida*–streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathogens*, **14(12)**, e1007342.
21. Kostelac, D., Gerić, M., Gajski, G., Markov, K., Domijan, A. M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Svetec, I. K., Žunar, B. & Frece, J. (2020). Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal*, 104828.
22. Lamfon, H., Porter, S. R., McCullough, M., & Pratten, J. (2003). Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *European journal of oral sciences*, **111(6)**, 465-471.
23. Lee, S. H., & Kim, Y. J. (2014). A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Archives of microbiology*, **196(8)**, 601-609.
24. Li, J., Helmerhorst, E. J., Leone, C. W., Troxler, R. F., Yaskell, T., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Oppenheim, F. G. (2004). Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of applied microbiology*, **97(6)**, 1311-1318.

25. Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological reviews*, **50(4)**, 353.
26. López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2(7)**, a000398.
27. Matsubara, V. H., Bandara, H. M. H. N., Ishikawa, K. H., Mayer, M. P. A., & Samaranayake, L. P. (2016). The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. *Expert review of anti-infective therapy*, **14(7)**, 643-655.
28. Matsumoto-Nakano, M. (2018). Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Japanese Dental Science Review*, **54(1)**, 22-29.
29. Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, **4(2)**, 119-128.
30. McCall, A. D., Pathirana, R. U., Prabhakar, A., Cullen, P. J., & Edgerton, M. (2019). *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *NPJ biofilms and microbiomes*, **5(1)**, 1-12.
31. Meurman, J. H., & Stamatova, I. (2007). Probiotic applications in the oral cavity. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS*, **2(1)**, 1.
32. Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology*, **17(2)**, 73-87.
33. Nesbitt, W. E., Doyle, R. J., & Taylor, K. G. (1982). Hydrophobic interactions and the adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Infection and Immunity*, **38(2)**, 637-644.
34. Niimi, M., Cannon, R. D., & Monk, B. C. (1999). *Candida albicans* pathogenicity: a proteomic perspective. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, **20(11)**, 2299-2308.
35. O'Donnell, L. E., Millhouse, E., Sherry, L., Kean, R., Malcolm, J., Nile, C. J., & Ramage, G. (2015). Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Research*, **15(7)**.
36. Ostengo, M. D. C. A., & Nader-Macías, M. E. (2004). Hydroxylapatite beads as an experimental model to study the adhesion of lactic acid bacteria from the oral cavity to hard tissues. In *Public Health Microbiology* (pp. 447-452). Humana Press.
37. Pecharki, D., Petersen, F. C., Assev, S., & Scheie, A. A. (2005). Involvement of antigen I/II surface proteins in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius* biofilm formation. *Oral microbiology and immunology*, **20(6)**, 366-371.

38. Ramage, G., Walle, K. V., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2001). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*, **18(4)**, 163-170.
39. Scannapieco, F. A., Bergey, E. J., Reddy, M. S., & Levine, M. J. (1989). Characterization of salivary alpha-amylase binding to *Streptococcus sanguis*. *Infection and immunity*, **57(9)**, 2853-2863.
40. Smith, A. V., & Bowen, W. H. (2000). In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Archives of Oral Biology*, **45(4)**, 277-291.
41. Sookkhee, S., Chulasiri, M., & Prachyabrued, W. (2001). Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *Journal of applied microbiology*, **90(2)**, 172-179.
42. Spormann, A. M. (2008). Physiology of microbes in biofilms. In *Bacterial Biofilms* (pp. 17-36). Springer, Berlin, Heidelberg.
43. Šusković, J., Kos, B., & Matošić, S. (1998). Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend?. *Mljekarstvo*, **48**, 165-176.
44. Šušćović, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., & Pavunc, A. L. (2009). Probiotički koncept–probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **4(3-4)**, 77-84.
45. Whiley, R. A., & Beighton, D. (1991). Emended descriptions and recognition of *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, and *Streptococcus anginosus* as distinct species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **41(1)**, 1-5.
46. Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T., & McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Applied and environmental microbiology*, **64(10)**, 4035-4039.
47. Xu, P., Alves, J. M., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L. S., Manque P., Xiuchun G., Serrano, M. G., Puiu D., Wang, Y., Chaplin, M. D., Akan, D., Paik, S., Peterson, D. L., Macrina, F. L., Buck, G. A. & Hendricks, S. (2007). Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *Journal of bacteriology*, **189(8)**, 3166-3175.
48. Zhu, B., Macleod, L. C., Kitten, T., & Xu, P. (2018). *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future microbiology*, **13(08)**, 915-932.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Jadranki Frece što je prihvatila mentorstvo za izradu mog završnog rada. Također, zahvaljujem se tehničarkama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica u pomoći pri uzgoju kultura za potrebe eksperimentalnog rada te na savjetima i naučenim vještinama. Posebno velika zahvala asistentu Deniju Kostelcu, mag. ing., na pomoći, strpljenju i odvojenom vremenu pri izradi ovog završnog rada te udijeljenom znanju koje ću koristiti i u budućnosti. Veliko hvala obitelji i prijateljima koji su mi omogućili da ove tri godine studiranja prođu brzo i u veselju.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


ime i prezime studenta