

Karakterizacija probiotičkih bakterija za primjenu u zaštiti dentooralnog zdravlja

Tankosić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:964237>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Marija Tankosić

7583/PT

**KARAKTERIZACIJA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA ZA PRIMJENU U
ZAŠTITI DENTOORALNOG ZDRAVLJA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija namirnica

Mentor: Prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Karakterizacija probiotičkih bakterija za primjenu u zaštiti dentooralnog zdravlja **Marija Tankosić, 0058212689**

Sažetak:

Zbog loše oralne higijene u Republici Hrvatskoj se sve češće javljaju dentooralna oboljenja koja predstavljaju veliku opasnost za čovjekovo zdravlje. Skupocjenost i dugotrajnost samog liječenja potaknule su znanstvenike diljem svijeta na istraživanja i pronalazak novih metoda prevencija istih. Uz bolju oralnu higijenu, korištenjem fluora u raznim varijantama, zanimljivom se pokazala upotreba bakterija mliječne kiseline s probiotičkim djelovanjem. Cilj ovoga rada bilo je ispitati probiotički potencijal odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline i vidjeti kakav će utjecaj imati na inhibiciju stvaranja biofilмова uzročnika dentooralnih tegoba: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus intermedius* te *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Obzirom da se radi o usnoj šupljini, u uvjetima simulirane sline određena je sposobnost preživljenja probiotika te autoagregacija i koagregacija probiotičkih bakterija *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1 s navedenim patogenima. Rezultati su pokazali visok stupanj preživljenja u uvjetima sline te značajnu sposobnost koagregacije i inhibicije biofilмова bakterija uzročnika dentooralnih oboljenja.

Ključne riječi: dentalni patogeni, dentooralna oboljenja, probiotici

Rad sadrži: 24 stranice, 7 slika, 6 tablica, 38 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici

Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: Deni Kostelac, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 17. lipnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology

Characterization of probiotic bacteria for application in dentooral health
protection

Marija Tankosić, 0058212689

Abstract:

Due to poor oral hygiene in the Republic of Croatia, dentooral diseases are increasingly occurring, which pose a great danger to human health. The costliness and longevity of the treatment itself have encouraged scientists around the world to research and find new methods of prevention. In addition to better oral hygiene, the use of fluoride and the use of lactic acid bacteria with probiotic potential proved to be interesting. The aim of this study was to examine the probiotic potential of selected strains of lactic acid bacteria and see what effect they will have on the inhibition of biofilm production of dental problems causing: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus intermedius* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Since it is an oral cavity, the ability of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* KO9 and *Lactobacillus plantarum* M1 to survive in simulated saliva and autoaggregate and coaggregate with the mentioned pathogens was determined. The results showed a high survival rate under saliva conditions and a significant ability to coaggregate and inhibit biofilms of bacteria causing dentooral diseases.

Keywords: probiotics, dental pathogen, dentooral disease

Thesis contains: 24 pages, 7 figures, 6 tables, 38 references, 0 supplements

Original in: Croatia

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: June 17th 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MIKROBIOLOŠKI POGLED NA DENTOORALNA OBOLJENJA	2
2.2. BAKTERIJE RODA <i>Streptococcus</i>	3
2.2.1. <i>Streptococcus mutans</i>	4
2.2.2. <i>Streptococcus sanguinis</i>	4
2.2.3. <i>Streptococcus intermedius</i>	4
2.3. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5
2.4. PROBIOTICI	5
2.4.1. Probiotici u zaštiti dentooralnog zdravlja	5
2.4.2. Mehanizmi djelovanja probiotika	6
2.5. MJERE PREVENCIJE ZUBA OD NAVEDENIH PATOGENA	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. MATERIJALI	8
3.1.1. Mikroorganizmi	8
3.1.2. Hranjive podloge	8
3.1.3. Popis korištene aparature i pribora	9
3.1.4. Popis korištenih kemikalija	10
3.2. METODE RADA	10
3.2.1. Simulacija sline	10
3.2.1.1. Sposobnost preživljavanja u uvjetima simulirane sline	11
3.2.2. Sposobnost inhibicije formiranja biofilмова	11
3.2.2.1. Uzgoj mikroorganizama	11
3.2.2.2. Priprava bakterijskih suspenzija patogenih bakterija i bakterija mliječne kiseline	11
3.2.2.3. Autoagregacija i koagregacija probiotika i patogenih mikroorganizama	12
3.2.2.4. Statistička obrada podataka	12
3.2.3. PRIPREMA SUPERNATANTA BAKTERIJA <i>L. plantarum</i> KO9 i <i>L. plantarum</i> M1	13
3.2.3.1. Inhibicija rasta biofilмова bakterijskih patogena u različitim razrjeđenjima supernatanta sojeva <i>L. plantarum</i>	13
3.2.3.2. Statistička obrada podataka	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Sposobnost preživljavanja u uvjetima simulirane sline	14
4.2. Sposobnost autoagregacije i koagregacije	15

4.3. Inhibicija rasta biofilмова.....	17
5. ZAKLJUČAK.....	20
6. LITERATURA.....	21

1.UVOD

U novije vrijeme sve se više stavlja naglasak na prevenciju dentooralnih oboljenja koje se javljaju već u ranim godinama života. Detaljno poznavanje usne šupljine, sastava sline i različitog utjecaja različitih vrsta patogena na formiranje biofilмова služe kao temelj prevencije oboljenja i uvelike doprinose razvoju novih modela prevencije bolesti. Pozitivni trend smanjenja obolijevanja postiže se boljom brigom i higijenom usne šupljine, korištenjem različitih pasti za zube koje sadržavaju fluor, fluoridizacijom mlijeka te periodičkim kontrolnim stomatološkim pregledima.

Biofilm, poznatiji pod imenom zubni plak, je višestanična zajednica mikroorganizama bakterijskog podrijetla koje u agregatima drži ekstracelularni matriks proizveden od samih bakterija. Nastaje pričvršćivanjem bakterijskih stanica pomoću bičeva za stanicu domaćina. Bakterije koje ga tvore čine simbiozu gdje otpuštanjem i primanjem različitih hranjivih tvari svi članovi imaju koristi. Aktivna površina biofilma u prisutnosti ugljikohidrata, posebice šećera, tokom duljeg vremena uzrokuje dentooralna oboljenja. Najčešći uzročnici dentooralnih oboljenja koji dominiraju usnom šupljinom, rastu i razmnožavaju se u biofilmovima su predstavnici bakterija roda *Streptococcus* i *Aggregatibacter*.

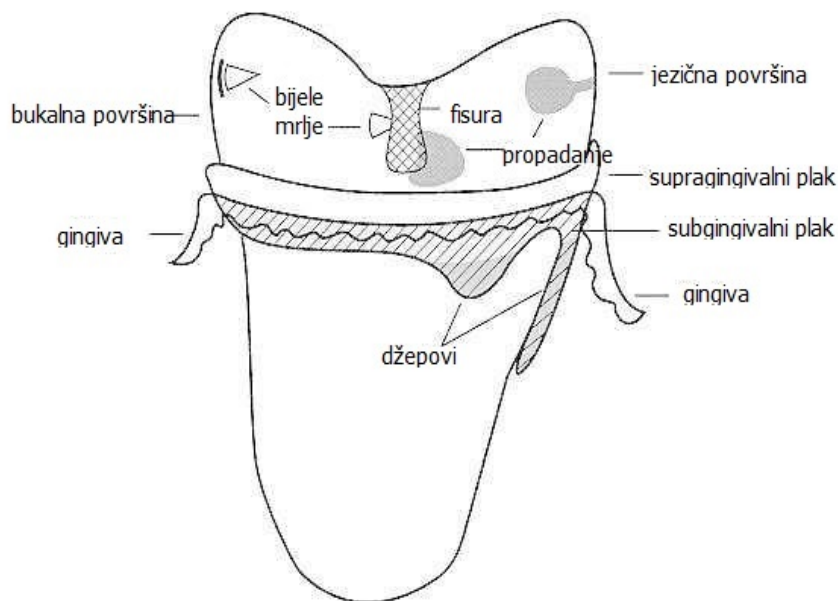
Zbog sve veće prisutnosti antimikrobne rezistencije, stomatološka, ali i biotehnološka struka moraju razvijati nove načine prevencija i suzbijanja dentooralnih oboljenja. U tu svrhu sve su popularniji probiotici, žive kulture stanica koje su sastavni dio gastrointestinalnog sustava. Poželjna svojstva koja bi probiotičke bakterije trebale imati su autoagregacija i koagregacija s drugim patogenim mikroorganizmima jer se na taj način sprečava njihova kolonizacija što je ujedno i efekt koji se želi postići.

Cilj ovog rada bila je probiotička karakterizacija bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* M1 i *Lactobacillus plantarum* KO9, kako bi se ispitao potencijal u prevenciji i zaštiti od dentooralnih oboljenja. Mjerena je sposobnost inhibicije biofilмова patogenih bakterija *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus intermedius* te *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Obzirom da se radi o usnoj šupljini, odredili smo također sposobnost preživljavanja probiotika u simuliranoj slini jer ona predstavlja prirodno stanište bakterijskim vrstama korištenim u ovom istraživanju te sposobnost koagregacije potencijalnih probiotika s patogenim bakterijama. Istraživane bakterije iskazale su visok probiotički potencijal za dentooralnu primjenu, preko inhibicije patogenih bakterija i visokog stupnja preživljenja i koagregacije u simuliranim uvjetima usne šupljine.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROBIOLOŠKI POGLED NA DENTOORALNA OBOLJENJA

Slina je puferska otopina bogatog kemijskog sastava, koja uz ione i fizikalno vezane plinove, sadrži još lipide, proteine, vitamine, enzime i razne druge hranjive tvari te predstavlja odličnu hranjivu podlogu za rast i razvoj mikroorganizama (Montalto i sur., 2003). Usna šupljina sadrži više od 700 različitih taksonomski identificiranih bakterija (Dewhirst i sur., 2010), a neke od njih usko su povezane s mehanizmom nastanka karijesa. Većina njih razvila je simbiozni odnos s čovjekom kao domaćinom. Narušavanjem tog odnosa dolazi do pojave oboljenja poput parodontitisa, karijesa, upala gingive. Simbioza se može narušiti na različite načine, ponajprije lošom oralnom higijenom, pušenjem, lošom prehranom te ostalim faktorima koji će dovesti do povećanja zubnog plaka, kolonija bakterija te posljedično i oboljenja. Pojava raznih bolesti rezultat je poremećaja ravnoteže u prirodnom ekosustavu. Bakterije prisutne u biofilmovima su uvijek metabolički aktivne i uzrokuju izmjene pH vrijednosti što u konačnici rezultira otapanjem tvrdog zubnog tkiva i nastanka karijesa (Kidd i Fajerskov, 2004). Nakon prehlade, zubni karijes predstavlja drugu po redu bolest glede rasprostranjenosti koja obuhvaća ljude svih dobnih skupina (Isalm i sur., 2010). Parodontne bolesti predstavljaju upalu gingive i okolnog vezivnog tkiva zbog nakupina koloniziranih bakterija na površinama u usnoj šupljini. Postoje 2 velike skupine, gingivitis i parodontis. Bakterije koje se nalaze u zubnom plaku, ponajviše *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* razrađuju različite spojeve kao što su sumporovodik, amonijak, amini, enzimi (poput kolagenaze) i antigeni koji prodiru u gingivu i uzrokuju protuupalni odgovor (Loesche, 1996). Poprečni prikaz presjeka zuba i područja koja obuhvaćaju bolesti prikazan je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz presjeka zuba koji prikazuje karijes i oštećenja. (Preuzeto i dorađeno prema Walter J. Loesche, 1996.)

Zbog sve češćih pojava dentooralnih obolijevanja i njihovog skupog liječenja naglasak se stavlja na prevenciju. Alternativni i vrlo uspješan način u borbi protiv patogenih mikroorganizama u ustima predstavljaju probiotici (Hasslöf i Stecksén-Blicks, 2020). Da bi njihov blagotvorni učinak mogao doći do izražaja, logično je da moraju imati sposobnost formacije biofilмова koji djeluju kao zaštitna podloga za usna tkiva protiv oralnih bolesti te kompetitivno isključuju patogene.

2.2. BAKTERIJE RODA *Streptococcus*

Bakterije roda *Streptococcus* su mnogobrojna i raznolika zajednica različitih vrsta bakterija, kuglastog oblika povezanih međusobno u lance ili parove, jako su rasprostranjeni uključujući i usnu šupljinu koja im predstavlja prirodno stanište. Rod *Streptococcus* trenutno obuhvaća više od 100 prepoznatih vrsta, a zasigurno se može očekivati da će se ovaj broj povećavati dostupnošću tehnologija sekvenciranja slijedeće generacije (Spellerberg, B. and Brandt, C. 2015). Samu skupinu čine kako nepatogene bakterije, sudionici normalne flore kod ljudi, tako i patogene vrste koje izazivaju razne bolesti. Gram-pozitivne vrste, *Streptococcus sanguinis* i *Streptococcus mutans* pripadaju većoj skupini *Streptococcus viridans*, poznate još kao i oralni streptokoki, glavni su uzročnici karijesa zuba. Da bi neka bakterija bila uzročnik karijesa i dentooralnih oboljenja ona mora ispunjavati neke zahtjeve poput stvaranja

ekstracelularnih i intracelularnih polisaharida, sposobnost pretvorbe ugljikohidrata-šećera u kiseline, sposobnost preživljavanja i djelovanja u ekstremnim uvjetima kao što je niski pH okoline.

2.2.1. Streptococcus mutans

Streptococcus mutans je anaerobna, Gram-pozitivna bakterija okruglastog oblika koja može obitavati u organima probavnog sustava, posebice ustima, ždrijelu i crijevima. Usko je vezana uz nastanak karijesa, posljedično i dentooralnih oboljenja. Uz probiotičke bakterije roda *Lactobacillus*, glavni je uzročnik kisele sredine koja uzrokuje demineralizaciju i narušavanje zubne cakline odnosno početak propadanja zuba. Biokemijska svojstva stvaranja izvanstaničnih polisaharida iz saharoze je jedan od glavnih čimbenika kariogenosti ove bakterije (Shellis i Dibdin, 1988). Glukan i fruktan kao glavni predstavnici izvanstaničnih polisaharida, smanjuju propusnost i povećavaju obujam plaka. Na taj način sprečavaju kiselinama izlazak iz plaka, nakon čega one prodiru do površine zuba i izazivaju demineralizaciju. Ovisno o trajnosti demineralizacije, posljedično dolazi do nastanka karijesa.

2.2.2. Streptococcus sanguinis

Streptococcus sanguinis je Gram-pozitivna, fakultativno anaerobna komenzalna bakterija iz skupine *Streptococcus viridans* koju u velikim količinama možemo pronaći u dentobakterijskom plaku. Jedna je od prvih bakterija koja kolonizira usnu šupljinu (Scnapiecco i sur., 1989). Nepolarnim, hidrofobnim interakcijama natječe se u vezanju za zubnu površinu s dominantnom vrstom *Streptococcus mutans*. Kariogeni potencijal vrste *Streptococcus sanguinis* smatra se niskim u usporedbi s potencijalom vrste *Streptococcus mutans* (Caufield i sur., 2000). Oralni streptokoki, ponajprije vrsta *Streptococcus sanguinis*, uzročnici su infektivne bolesti endokarditisa do koje može doći nakon stomatoloških zahvata, ulaskom bakterija u krvotok. Drugi izvori bakterijemije¹, koji mogu uključivati prehranu ili druge svakodnevne aktivnosti mogu također biti odgovorni za tu, po život opasnu bolest (Paik i sur., 2005). Stoga, jako je važno voditi brigu o oralnom zdravlju i higijeni usne šupljine.

2.2.3. Streptococcus intermedius

Gram-pozitivna, komenzalna i aerotolerantna bakterija, *Streptococcus intermedius* pokazuje široku patogenost i izolirana je kod pacijenta liječenog od parodontitisa. Pripada skupini *Streptococcus anginosus*, poznate još i kao „*Streptococcus milleri group*“ (SMG) u koju uz gore navedeni *Streptococcus intermedius*, ubrajamo još i *Streptococcus anginosus* i *Streptococcus constellatus*. Asimptomatski kolonizira dijelove tijela i na taj način uzrokuje

¹ Bakterijemija-prisutnost bakterija u krvnoj plazmi

stvaranje gnojnih infekcija glave, vrata, dišnih puteva i usne šupljine, odnosno mjesta na kojima normalno obitava pa su zbog toga najčešće bolesti uzrokovane ovim patogenom upale jetre, pluća, dišnih puteva i meningitis.

2.3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans je Gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija koja kolonizira usnu šupljinu i uzrokuje propadanje zubnog mesa te ju nerijetko povezujemo s opasnom dentalnom bolesti, parodontitisom. Smatra se sistemskim patogenom jer je izoliran i iz brojnih drugih oboljelih mjesta u tijelu (Kachlany, 2010). Prianjanje na epitelne i zubne površine ovisi o prisutnosti površinskih proteina i struktura kao što su mikročestice i fimbrije² (Raja, Ummer, Dhivaker, 2014). Sposobnost smanjenja kisika u tkivima dovodi do ozbiljnih oralnih infekcija. Postoji nekolicina čimbenika virulentnosti ovog patogena te su podijeljeni u grupe obzirom na svojstva onih koji (I) moduliraju upale, (II) potiču uništavanje tkiva i (III) one koji inhibiraju obnavljanje tkiva. (Kesić LJ. i sur., 2009). Najpoznatiji je izlučivanje leukotoksina A koji pomaže bakteriji da izbjegne imunosti odgovor tijekom infekcije tako što ciljano uništava bijele krvne stanice-leukocite. Koliko je ovaj patogen opasan govori i činjenica da pripada skupini Gram-negativnih bakterija koje uzrokuju infektivni endokarditis. (Das i sur., 1997).

2.4. PROBIOTICI

Probiotici su živi mikroorganizmi čijim se redovitim uzimanjem može povoljno utjecati na zdravlje, kako čovjeka tako i životinja, u prvoj mjeri jačajući imunološki sustav (Šušćović i sur., 1988). Konzumacijom probiotika uspostavlja se ravnoteža u gastrointestinalnom sustavu domaćina. Probiotičke bakterije inhibiraju stvaranje toksičnih tvari nastalih uslijed stresa, bolesti, uzimanja jakih antibiotika i lijekova te raznih drugih čimbenika koji nepovoljno utječu na cjelokupni organizam. Mogu biti u obliku bakterija, plijesni i kvasaca. Najčešće korišteni probiotici su različite vrste rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* poput *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*. Godine istraživanja ukazuju na pozitivne učinke probiotičkih bakterija, od imunomodulacijskih do mnogih drugih dokumentiranih učinaka (Frece 2007; Frece et al. 2005, 2009).

2.4.1. Probiotici u zaštiti dentooralnog zdravlja

Propisanim određenim dnevnim dozama, kroz duži vremenski period, probioticima možemo povoljno utjecati na dentooralno zdravlje. Njihova kolonizacija i sposobnost prianjanja za

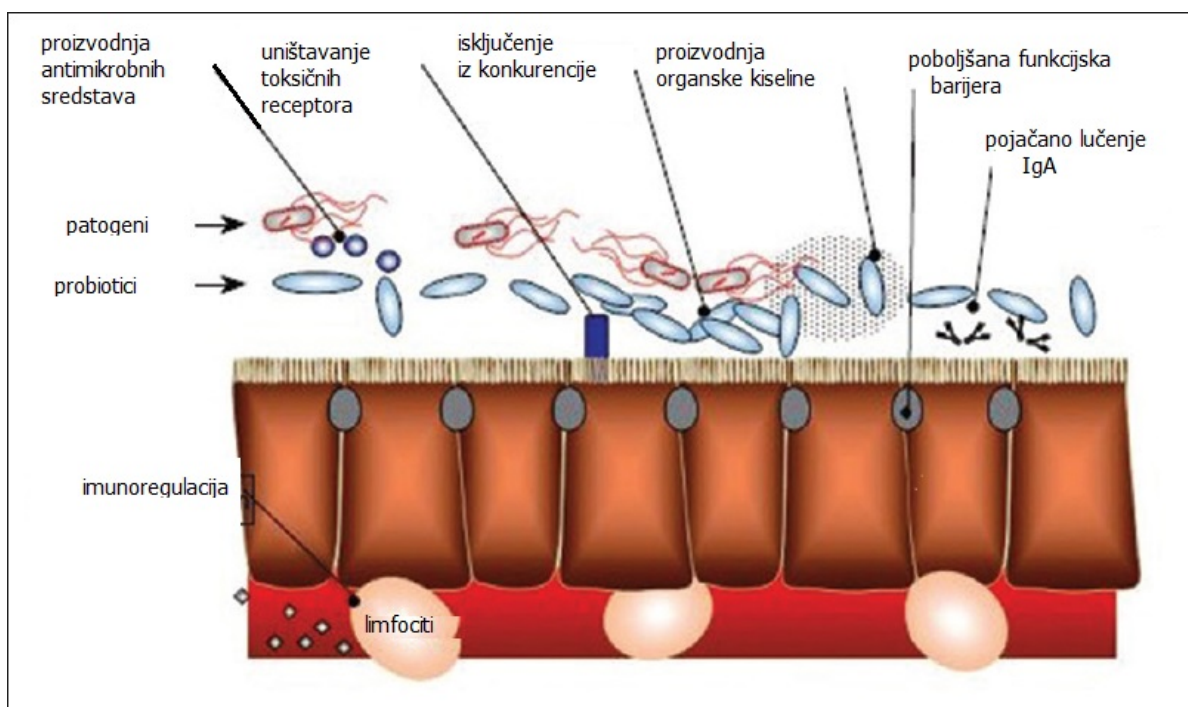
²Fimbrije- tvorbe („nožice“) koje se nalaze na površini Gram-negativnih bakterija

komponentne usne šupljine pokazale su se od velikog značaja te je to jedan od glavnih čimbenika zašto se koriste u prevencijama dentooralnih oboljenja (Gregurek, 1999). Provedena brojna istraživanja dokazala su da konzumacijom raznih mliječnih kultura s probiotičkim pripravcima možemo preventivno smanjiti karijes i oštećenja zuba, a za osobe koje nisu ljubitelji mliječnih proizvoda, danas na tržištu postoje različite alternative i pripravci poput kapsula, tableta te tekućih doza probiotika (Živković, 2020). Istraživanje koje su proveli Nikawa i sur., 2010. pokazalo je da konzumacijom jogurta koji je sadržavao probiotike, koncentracija bakterije *Streptococcus mutans* smanjena je za čak 80%. Cilj upotrebe probiotika u terapiji dentooralnih oboljenja je inhibiranje specifičnih patogenih mikroorganizama ili mijenjanje imunološkog odgovora domaćina (Glažar i sur., 2014), specifično *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kada je u pitanju parodontitis ili razni sojevi bakterija roda *Streptococcus* kada se radi o zubnom karijesu.

2.4.2. Mehanizmi djelovanja probiotika

Bakterije mliječne kiseline najčešće se upotrebljavaju kao probiotici, te one mogu djelovati na sljedeće načine: vežu se za različite dijelove usne šupljine (zube, dentobakterijski plak, meke naslage); mijenjaju okolinu, čime onemogućuju nastanak bolesti; stvaraju različite antimikrobne tvari; potiču imunološki sustav; mijenjaju pH usne šupljine čime se stvaraju uvjeti za zdraviju okolinu (Glažar i sur., 2014). Neki od tih mehanizama prikazani su na Slici 2. Proizvodnjom metabolita poput mliječne i octene kiseline, vodikova peroksida i bakteriocina³ probiotici pokazuju visoku antimikrobnu aktivnost prema Gram pozitivnim bakterija kakve prevladavaju u usnoj šupljini. Djelotvornost pojedinog probiotika ovisi o soju, te se efikasnost pojedinog soja ne može pripisati nekom drugom, srodnom soju (Haukioja, 2019).

³Bakteriocini-proteinski ili peptidni toksini koji proizvode bakterije u svrhu inhibicije rasta sličnog ili usko povezanog bakterijskog soja



Slika 2. Mehanizam djelovanja probiotika (preuzeto i dorađeno od Dastoor i sur., 2018.)

2.5. MJERE PREVENCIJE ZUBA OD NAVEDENIH PATOGENA

U današnje vrijeme sve je više ljudi kod kojih se javljaju dentooralna oboljenja stoga prevencija i samo liječenje dok još bolest nije uznapredovala predstavlja velik korak ka suzbijanju i daljnjem širenju bolesti. Učestalim pranjem zuba, ispiranjem s vodicama za usta te redovitim odlaskom kod stomatologa na pregled usne šupljine možemo preventivno djelovati da ne dođe do pojave karijesa, a kasnije i bolesti uzrokovano istim.

Bolesti koje se javljaju u usnoj šupljini najčešće se liječe antibioticima, antibakterijskim lijekovima koji uspješno liječe infekcije izazvane patogenima kojima je usna šupljina prirodno stanište. Najčešće se koriste antibiotici iz skupine penicilina, tetraciklina, makrolida, linkozamida, fluorokinolona (Goretić, 2019). Kod liječenja, bitno je poznavati svojstva pojedinih antibiotika, njihovo djelovanje, način primjene te nuspojave koje mogu izazvati. Ukoliko je došlo do pojave rezistentnosti pojedinih patogena na djelovanje antibiotika pribjegava se drugim metodama liječenja i prevencije.

Antimikrobna rezistencija javlja se kada su patogeni razvili otpornost na djelovanje antibiotika i drugih lijekova te neometano mogu rasti i razmnožavati se u njihovom prisustvu. Iz tog razloga danas se sve više koriste probiotici kao prirodan način sprečavanja zaraze (Gregurek, 1999).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Prilikom izrade ovog rada korištena su četiri soja patogenih bakterija: *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068, *Streptococcus intermedius* DSM 20573, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSM 11123. Korišteni mikroorganizmi pohranjeni su u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Kao potencijalne probiotičke bakterije korištena su dva odabrana soja bakterija mliječne kiseline koja su se u prijašnjim eksperimentalnim radovima pokazala kao najbolja (Sušac, 2020), a to su *Lactobacillus plantarum* KO9 izolirana iz kobiljeg mlijeka i *Lactobacillus plantarum* M1 izolirane iz mlijeka magarice.

3.1.2. Hranjive podloge

Za uzgoj patogenih bakterija *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus intermedius* korišten je M17 bujon, a za uzgoj bakterija mliječne kiseline korišten je MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) selektivna hranjiva podloga za uzgoj bakterija roda *Lactobacillus* te konačno, za uzgoj patogene bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* korištena je TSB (Tryptic soy broth) hranjiva podloga. MRS podloga pripremljena je pri pH 6,5; sterilizirana u autoklavu na temperaturi 121 °C kroz 15 minuta. M17 podloga pripremljena pri pH 7,1; sterilizirana u autoklavu na temperaturi 121 °C kroz 15 minuta. TSB podloga pripremljena je pri pH 6,5; sterilizirana u autoklavu na temperaturi 121°C kroz 15 minuta. Sastav navedenih podloga nalazi se u dolje navedenim tablicama 1 – 3.

Tablica 1. Sastav MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) bujona za uzgoj bakterija roda *Lactobacillus*

SASTOJCI	KONCENTRACIJA (g/L)
Pepton	10,0
Govedi ekstrakt	10,0
Ekstrakt kvasca	5,0
Glukoza	20,0
Dinatrijev hidrogenfosfat	2,0

Natrijev acetat	5,0
Amonijev citrat	2,0
Magnezijev sulfat	0,2
Manganov sulfat	0,05
Tween 80	1,0

Tablica 2. Sastav M17 bujona za uzgoj patogenih bakterija *Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguinis*

SASTOJAK	KONCENTRACIJA (g /L)
Pepton iz kazeina	2,5
Pepton	2,5
Sojin pepton	2,5
Kvašćev ekstrakt	5,0
Goveđi ekstrakt	5,0
Natrijev glicerofosfat	19,0
Magnezijev sulfat	0,25
Askorbinska kiselina	0,5
Laktoza	5,0

Tablica 3. Sastav TSB (Tryptic soy broth) bujona za uzgoj bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

SASTOJAK	KONCENTRACIJA (g /L)
Kazein	17,0
Soja	3,0
Natrijev klorid	5,0
Glukoza	2,5
K_2HPO_4	2,5

3.1.3. Popis korištene aparature i pribora

- ✚ Centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- ✚ Čitač mikrotitarskih pločica (Sunrise (Tecan,Grödig, Austrija)
- ✚ Spektrofotometar (Helios B UV-Vis Unicam, Cambridge, UK)

- ✚ Polistirenske mikrotitrarske pločice (96 bunarčića) (Deltalab, Barcelona, Španjolska)
- ✚ Pipete od 10 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ✚ Pipetman 20 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ✚ Pipetman 10 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ✚ Pipeta 1 mL
- ✚ Analitička vaga Sartorius (Zagreb, Hrvatska)
- ✚ Erlenmayerova tikvica
- ✚ Bunsenov plamenik
- ✚ Vibromješač EV-102 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- ✚ Kivete 15 mL

3.1.4. Popis korištenih kemikalija

- ✚ Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- ✚ Octena kiselina 33% (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- ✚ Kristal violet 1% (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ✚ MRS bujon (de Man, Rogosa, Sharpe, Milan, Italija)
- ✚ M17 bujon (Biolife, Milan, Italija)
- ✚ TSB bujon (Tryptic soy broth, Biolife, Milano, Italija)

3.2. METODE RADA

3.2.1 Simulacija sline

U svrhu simulacije prirodnih uvjeta za ovaj eksperiment napravili smo simuliranu otopinu sline koja predstavlja medij u kojem normalno obitavaju patogene bakterije korištene za ovaj završni rad. Sastojci u navedenim koncentracijama kako je prikazano u Tablici 4, izvagani su na analitičkoj vagi i prebačeni u Erlenmayerovu tikvicu te otopljeni u sterilnoj vodi.

Tablica 4. Sastav simulirane sline korištene u ovom radu

SASTOJAK	KONCENTRACIJA mg /L
KCl	72
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22
NaCl	60
KH_2PO_4	68

$KMCO_3$	150
KSCM	6
LIMUNSKA KISELINA	3
Na_2HPO_4	86,6 mg/L

3.2.1.1 Sposobnost preživljavanja u uvjetima simulirane sline

Bakterijske stanice su resuspendirane u simuliranoj otopini sline koja je napravljena prema Tablici 1, mjerena je sposobnost preživljavanja bakterijskih stanica unutar 24h. Nakon 1h, 4h i 24h izuzimani su uzorci i naciepljivani na MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agar na kojem smo nakon određenog vremena određivali broj poraslih kolonija. Obzirom na usporedbu s kontrolnim početnim brojem, izračunat je postotak preživljavanja nakon različitog vremenskog perioda.

3.2.2.Sposobnost inhibicije formiranja biofilмова

3.2.2.1. Uzgoj mikroorganizama

Bakterijske vrste *Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius* i *Streptococcus sanguinis* naciepljene su u M17 bujon te inkubirane u termostatu na 37°C kroz 24-48h. Vrsta *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* naciepljena je na TSB bujon te inkubirana u termostatu na 37°C kroz 24-48h u mikroaerobnim uvjetima. Bakterije mliječne kiseline, odnosno probiotičke bakterije *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1 uzgajane su na MRS bujonu, inkubirane u termostatu na 37°C kroz 24-48h u aerobnim uvjetima.

3.2.2.2. Priprava bakterijskih suspenzija patogenih bakterija i bakterija mliječne kiseline

Nakon uzgoja patogenih bakterija u termostatu na 37°C kroz 24-48 h, bakterijske stanice zajedno s hranjivom podlogom su prebačene u kivete volumena 15 mL i centrifugirane 15 minuta na 6000 o/min (Hermle) kako bi odvojili supernatant od stanica u talogu. Dobiveni supernatant ispran je sa sterilnom fiziološkom otopinom. Slijedi ponovna centrifuga 15 minuta na 600 o/min. Supernatant je odvojen od taloga koji je resuspendiran u sterilnoj fiziološkoj otopini te takav spreman za daljnje analize. Isti postupak proveden je i s bakterijama mliječne kiseline, *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1.

3.2.2.3. Autoagregacija i koagregacija probiotika i patogenih mikroorganizama

Prethodno su uzgojene bakterijske stanice u termostatu na 37°C kroz 24-48h, u hranjivim podlogama TSB, MRS te M17 ovisno o kojoj je bakterijskom stanici riječ. Tako pripremljene stanice centrifugirane na 6000 o/min, dvaput isprane i resuspendirane u simuliranoj slini. Suspenzija stanica volumena 4 mL miješana je na vibromješaču EV-102 (Tehtnica, Železniki, Slovenija) u trajanju desetak sekundi da se dobije homogena otopina. Autoagregacija određena je nakon 5 sati inkubacije na sobnoj temperaturi. Svaki sat vremena uzeto je po 1 mL gornje suspenzije i prebačeno u epruvetu s 9 mL sterilne simulirane sline. Mjerena je apsorbancija na 600 nm na spektrofotometrijskom uređaju (Helios β UV-Vis Unicam, Cambridge, UK). Postotak autoagregacije se računao prema formuli (1) gdje A_t predstavlja apsorbanciju u vremenu t , a A_0 apsorbanciju na početku mjerenja.

Metoda pripreme stanica za koagregaciju je bila identična kao i za autoagregaciju. Jednake količine od 2 mL suspenzija bakterijskih stanica *Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguinis* te *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* s vrstama bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1 prebačene su u epruvete i miješane na Vibromješaču EV-102 (Tehtnica, Železniki, Slovenija). Apsorbancija je mjerena pri 600 nm na spektrofotometru (Helios β UV-Vis Unicam, Cambridge, UK) nakon 5 sati inkubacije na sobnoj temperaturi. Uzorci za određivanje apsorbancije u različitim vremenima uzimani su kao u postupku autoagregacije. Postotak koagregacije računat je prema formuli (2) gdje x predstavlja jednu komponentnu sadržaja epruvete, patogeni mikroorganizam, a y drugu komponentnu, probiotičku bakteriju.

3.2.2.4. Statistička obrada podataka

$$\frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\frac{\left(\frac{Ax+Ay}{2}\right) - A(x+y)}{Ax + \frac{Ay}{2}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.3. Priprema supernatanta bakterija *L. plantarum* KO9 i *L. plantarum* M1

Nakon prekonocnog uzgoja u autoklavima na 37°C bakterijske stanice su prebačene u kivete i centrifugirane na 6000 o/min 15 minuta kako bi izdvojili supernatant od stanica u talogu. Izdvojeni supernatant se dalje sterilizira kroz 0,22 µm filter i zaleđuju na -22°C do idućeg korištenja.

3.2.3.1. Inhibicija rasta biofilмова bakterijskih patogena u različitim razrjeđenjima supernatanta sojeva *L. plantarum*

Provedena je inhibicija rasta biofilma u mikrotitarskim pločicama na način da su tijekom 48h patogeni mikroorganizmi, uzročnici dentooralnih oboljenja uzgajani u prisustvu različitih razrjeđenja bakterija mliječne kiseline, *L. plantarum* KO9 i *L. plantarum* M1 pripremljenih na način koji je naveden u podnaslovu 3.2.2.5. Patogeni mikroorganizmi rodova *Streptococcus* i *Aggregatibacter* nacijepljeni su 3 različita razrjeđenja na podloge prikladne za njihov rast, rod *Streptococcus* u M17 bujonu, a *Aggregatibacter* u TSB bujonu. Nakon 48h inkubacije postavljen je eksperiment na mikrotitarskim pločicama. U svaku jažicu pipetmanom su dodavani različiti omjeri podloge za rast mikroorganizama, supernatanta BMK te suspenzije patogena prema tablici 5. Kontrole su bili uzorci bez prisutnosti probiotičkog supernatanta, a slijepe probe su činili neinokulirani uzorci. Eksperiment je za svaki uzorak rađen u triplicatu. Nakon 48h inkubacije na 37°C supernatant, suspenzija patogena i podloga za rast su uklonjeni i jažice su isprane pod mlazom sterilne vode. Ostatak stanica fiksiran je s 200 µL metanola u vremenu od 10 minuta, zatim je obojan s 200 µL 0.1% kristal violet kroz 10 minuta i na kraju 3 puta ispran vodom. Dodavanjem 200 µL 33% octene kiseline u svaku jažicu otopljeni su fiksirani ostatci boje i stanica. Sadržaj jažica se homogenizirao i spektrofotometrijski se odredila apsorbancija na 590 nm.

Tablica 5. Omjeri dodvanih tvari u jažice mikrotitarskih ploča

PODLOGA ZA RAST	SUSPENZIJA PATOGENA	SUPERNATANT BMK
90 µL	10 µL	100 µL
140 µL	10 µL	50 µL
180 µL	10 µL	10 µL

3.2.3.2. Statistička obrada podataka

Obzirom da su uzorci rađeni u triplikatima, izračunata je aritmetička sredina (3) za svaki uzorak i oduzeta je aritmetička sredina kontrole. Za svaki uzorak određena je i standardna devijacija prema formuli (4)

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=0}^n x_i}{n} \quad (3)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (4)$$

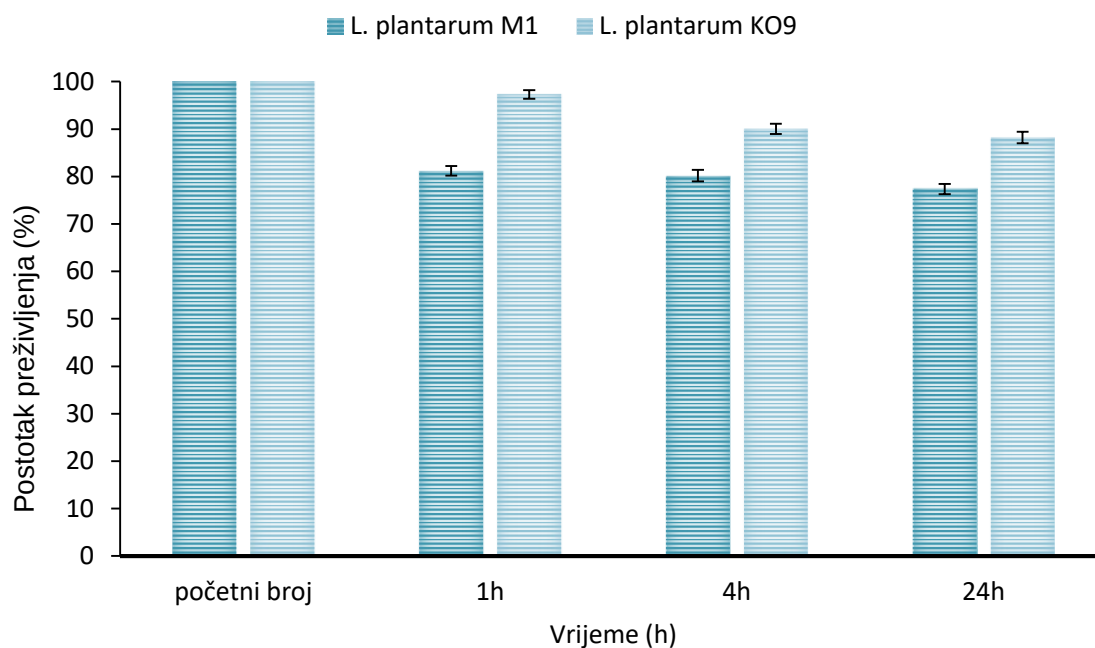
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu određena je sposobnost preživljavanja bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1 u uvjetima simulirane sline tijekom perioda od 24h. Nadalje, izračunata je sposobnost autoagregacije i koagregacije kao dva dominantna svojstva koja bi trebali imati organizmi kako bi se njihovo djelovanje moglo okarakterizirati kao probiotičko. Uz navedeno, mjerena je sposobnost inhibicije biofilma patogenih vrsta roda *Streptococcus* i *Aggregatibacter* u prisustvu različitih razrjeđenja supernatanta probiotičkih bakterija *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1 kroz 24 sata.

4.1. Sposobnost preživljavanja u uvjetima simulirane sline

Sposobnost preživljavanja u uvjetima sline mjerena je kroz 24 sata, intervalno nakon 1h, 4h i 24 h. Rezultati su prikazani sa slici 3. Postotak probiotičkih bakterija *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1 nakon izlaganja simuliranim uvjetima sline do krajnjih 77,5% za *Lactobacillus plantarum* KO9 te 88,24% za *Lactobacillus plantarum* M1 iz čega možemo zaključiti da soj *L. plantarum* KO9 ima bolju sposobnost preživljavanja u uvjetima simulirane sline. Nakon vremenskog perioda od 1h, kod *L. plantarum* M1 dolazi do značajnog pada u broju stanica od 20%, dok kod *L. plantarum* KO9 taj postotak iznosi svega 3%. Između vremena od 1h i 4h nisu zabilježene značajne promjene u postotku preživljavanja za soj *L. plantarum* M1 dok je za soj *L. plantarum* KO9 postotak preživjelih stanica pao za 7%. Iz navedenog se može zaključiti kako oba soja zadovoljavaju probiotički kriterij preživljavanja u uvjetima simulirane sline. Naime, 24 h preživljenja omogućuje kontinuiranu prisutnost značajnog broja probiotičkih stanica ukoliko se pretpostavi dnevna konzumacija probiotičkog

proizvoda. Pad broja probiotičkih živih stanica tijekom 24 h inkubacije primijetili su Haukioja sur. 2006 nakon što su ispitivali sposobnost preživljenja probiotičkih bakterija u slini. Rezultati navedenog istraživanja dijele sojeve na dvije kategorije; kategorija nepromijenjene CFU vrijednosti i kategorija blagog smanjenja CFU vrijednosti. U grupi s blagim smanjenjem nalazi se soj *L. plantarum*22V stoga su rezultati usporedivi s ovim istraživanjem.



Slika 3. Sposobnost preživljavanja vrsta *Lactobacillus plantarum* M1 i *Lactobacillus plantarum* KO9 u slini tijekom 24 sata. Sposobnost preživljavanja izražena je u postotcima $\pm$ standardna devijacija uzorka.

4.2. Sposobnost autoagregacije i koagregacije

U ovom eksperimentu mjerena je autoagregacija dentalnih patogena najčešćih uzročnika dentooralnih oboljenja. Ispitivani patogeni bili su *S. sanguinis*, *S. intermedius*, *S. mutans* i *A. actinomycetemcomitans*. Autoagregacija je jedan od uvjeta za uspješno prijanjanje na razne površine. Bakterija *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pokazala je najveću sposobnost autoagregacije od 73,63%, dok je najmanju sposobnost imala bakterijska vrsta *Streptococcus sanguinis*(30,6%) što upućuje da se *A. actinomycetemcomitans* nakuplja u veće globule i lako prijanja na površine. Za vrstu *Streptococcus intermedius* taj postotak iznosi 52,16%, a *Streptococcus mutans*44,28% što je negdje između vrsta *S. sanguinis* i *A. actinomycetemcomitans*. Koagregacijska sposobnost mjerena je između gore navedenih patogenih vrsta i bakterija mliječne kiseline kako je prikazano u Tablici 6. Rezultati ukazuju

da *Lactobacillus plantarum* KO9 ima manju sposobnost koagregacije s navedenim patogenim bakterijama naspram *Lactobacillus plantarum* M1. Bakterija *Streptococcus sanguinis* pokazala je značajno veću sposobnost koagregacije s BMK nego što je imala sposobnost autoagregacije što direktno upućuje na probiotičku sposobnost BMK. *Streptococcus intermedius* pokazuje bolju koagregaciju s *L. plantarum* M1, nego s vrstom *L. plantarum* KO9. *Streptococcus mutans* iskazuje suprotan učinak i bolje koagregira s vrstom *L. plantarum* M1, nego s *L. plantarum* KO9. Bakterija *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pokazuje veću sposobnost koagregacije s *L. plantarum* M1, nego s *L. plantarum* KO9. Dobiveni rezultati se mogu smatrati izvrsnima budući da su istraživanju Campana i sur., 2017. pokazali maksimalnu koagregaciju od 14 do 16 % za patogene bakterije (*Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* i *Echerichia coli*) nakon 6 h za sedam sojeva BMK izoliranih iz komercijalnih probiotičkih proizvoda. Probiotička primjena u dentalno protektivne svrhe se između ostalog treba temeljiti na sposobnosti koagregacije jer se tako omogućuje globuliranje patogenih bakterija i njihov prolazak do želuca u uvjete u kojima ne mogu preživjeti.

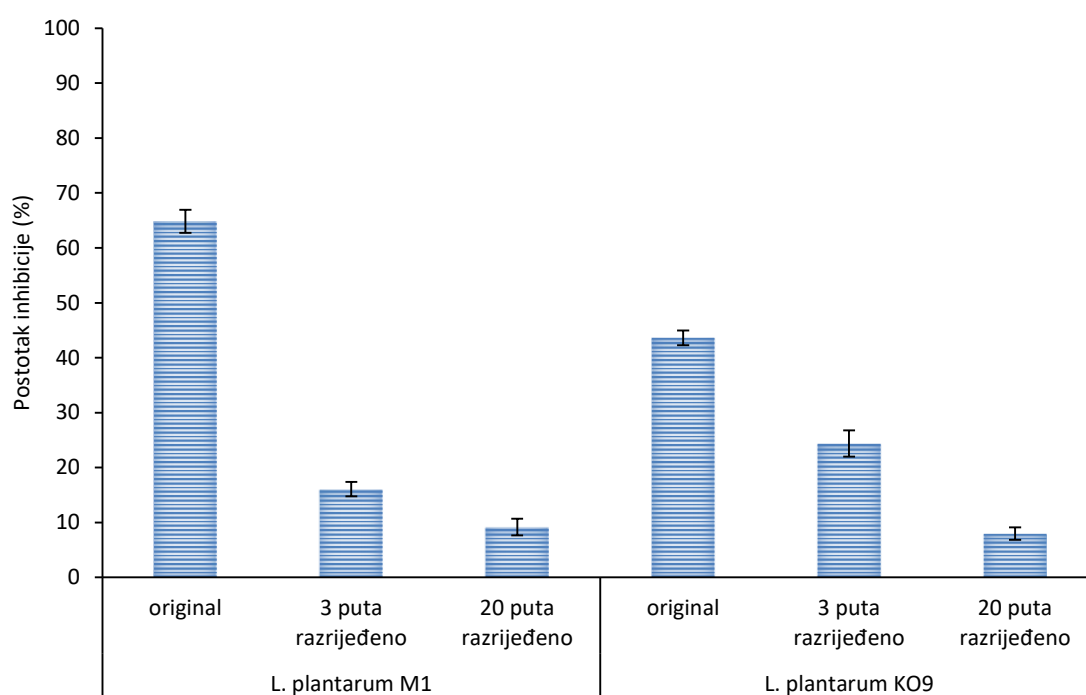
Tablica 6. Sposobnost autoagregacije određenih dentalnih patogena izražena u postotcima sa te njihova koagregacija s probiotičkim bakterijama. Prikazani rezultati su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Ispitivani dentalni patogen	Autoagregacija (%)	Koagregacija (%)	
		<i>L. plantarum</i> M1	<i>L. plantarum</i> KO9
<i>S. sanguinis</i>	30,6 $\pm$ 3,11	61,26 $\pm$ 3,21	61,75 $\pm$ 1,32
<i>S. intermedius</i>	52,16 $\pm$ 2,54	71,13 $\pm$ 2,11	60,74 $\pm$ 2,03
<i>S. mutans</i>	44,28 $\pm$ 2,71	66,95 $\pm$ 2,43	65,61 $\pm$ 3,47
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	73,63 $\pm$ 3,04	89,17 $\pm$ 3,31	76,89 $\pm$ 2,32

4.3. Inhibicija rasta biofilmova

Za istraživanje bakterija uzročnike dentooralnih oboljenja, ispitana je sposobnost formiranja biofilmova u prisutnosti različitih razrjeđenja supernatanta potencijalno probiotičkih bakterija BMK. Rezultati su prikazani na slikama 4 – 7.

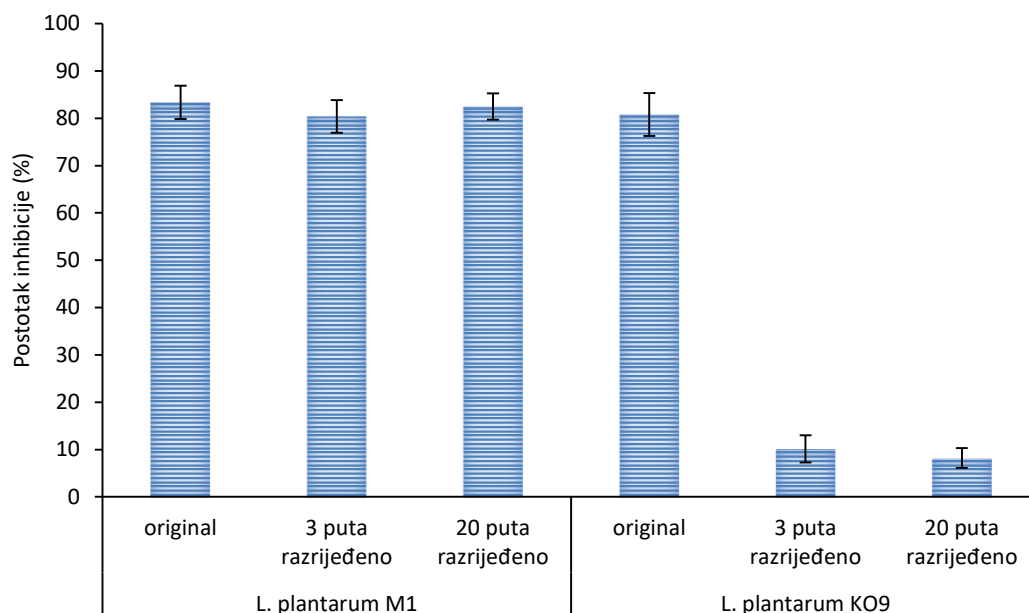
Postotak inhibicije biofilma *Streptococcus mutans* u prisustvu supernatanta *L. plantarum* M1 u prisustvu nerazrijeđenog supernatanta veći nego kod *L. plantarum* KO9 i iznosi značajnih 64 %. Pri oba probiotička supernatanta razrjeđenje značajno smanjuje postotak inhibicije što direktno ukazuje da je inhibicija ovisna o koncentraciji.



Slika 4. Prikaz sposobnosti inhibicije rasta biofilmova za bakterijskog patogena *Streptococcus mutans* u različitim razrjeđenjima u prisustvu supernatanta bakterija *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1. Rezultati su prikazani kao postotak mjerenja u triplikatu $\pm$ standardna devijacija.

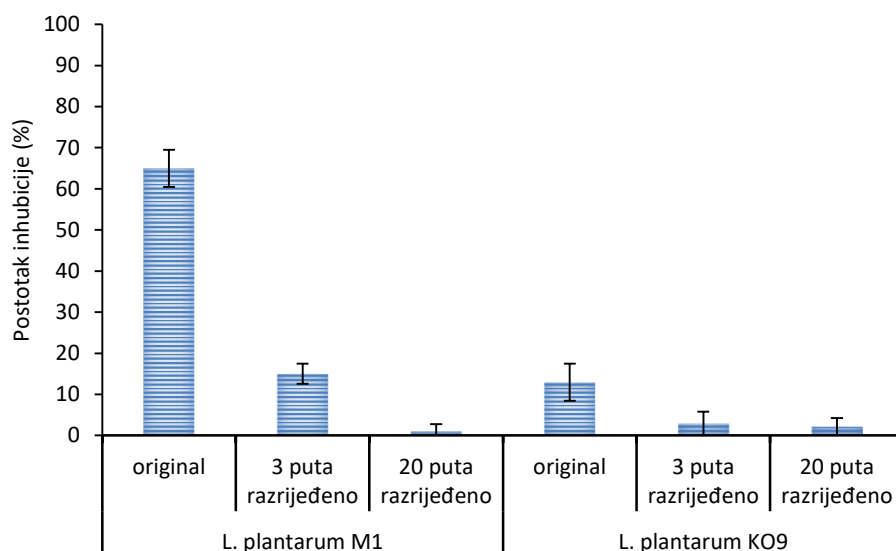
Postotak inhibicije biofilma *Streptococcus intermedius* bitno se razlikuje u prisustvu probiotičke bakterije *L. plantarum* M1 i *L. plantarum* KO9. Kao što se može vidjeti na slici 5, inhibicija rasta biofilma u sva 3 uzorka (original, 3 puta razrijeđeno i 20 puta razrijeđeno) u prisustvu *L. plantarum* M1 je vrlo visoka i iznosi preko 80%. U ovom slučaju zanimljivo nije došlo do pada inhibicije razrjeđenjem uzorka. Hipotetski takav trend mogao bi biti primijećen ukoliko je patogeni soj osjetljiv na niže pH vrijednosti kakve su inače vidljive u mediju BMK.

U prisustvu *L. plantarum* KO9 visok postotak inhibicije rasta biofilma uočen je samo kod nerazrijeđenog uzorka te taj postotak naglo pada već pri razrjeđenju od 3 puta na svega 10% te nakon 20 puta razrjeđenja postotak je neznatno pao. Razlika u reakciji patogenog soja na dva različita supernatanta govori o razlici među supernatantima te bi se taj fenomen trebao dodatno istražiti.



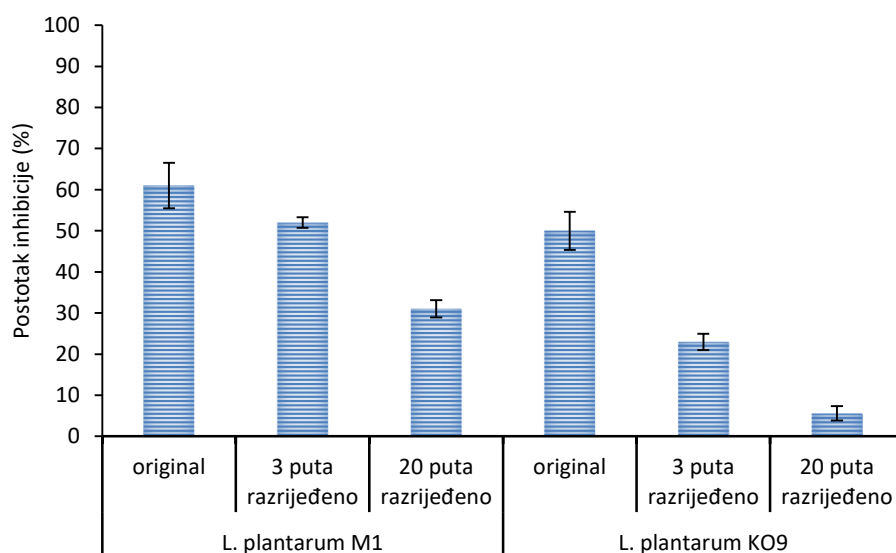
Slika 5. Prikaz sposobnosti inhibicije rasta biofilмова za bakterijskog patogena *Streptococcus intermedius* u različitim razrjeđenjima u prisustvu supernatanta bakterija *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1. Rezultati su prikazani kao postotak mjerenja u triplikatu $\pm$ standardna devijacija.

Na slici 6 prikazana je inhibicija biofilma *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* u prisustvu supernatanta probiotičkih bakterija. Nerazrijeđeni supernatant *L. plantarum* M1 značajno inhibira formaciju biofilma (65 %) te taj postotak pada s razrjeđenjem. *L. plantarum* KO9 mnogo slabije inhibira patogeni biofilm te u nerazrijeđenom obliku ostvaruje maksimalnu inhibiciju od skoro 3 %. Navedeno jasno ukazuje na ranije spomenute razlike među supernatantima koje su vidljive u razlici inhibicije. Unatoč razlici, inhibicija i dalje pokazuje ovisnost o koncentraciji supernatanta.



Slika 6. Prikaz sposobnosti inhibicije rasta biofilmova za bakterijskog patogena *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* u različitim razrjeđenjima u prisustvu supernatanta bakterija *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1. Rezultati su prikazani kao postotak mjerenja u triplikatu $\pm$ standardna devijacija.

Postotak inhibicije biofilma *Streptococcus sanguinis* prikazanog na slici 7, najvišu vrijednost ostvaruje kod L. plantarum M1 no nije značajno različit naspram L. plantarum KO9. Ovisnost inhibicije o koncentraciji je primijećena i u ovom eksperimentu.



Slika 7. Prikaz sposobnosti inhibicije rasta biofilmova za bakterijskog patogena *Streptococcus sanguinis* u različitim razrjeđenjima u prisustvu supernatanta bakterija *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M1. Rezultati su prikazani kao postotak mjerenja u triplikatu $\pm$ standardna devijacija.

Sumarno, rezultati ukazuju na potencijal istraživanih sojeva BMK za primjenu u dentooralnog zaštiti. *L. plantarum* M1 iskazuje nešto veći inhibitorni potencijal nego *L. plantarum* KO9. Isticanje navedenog soja je zanimljivo, posebice u usporedbi s *L. plantarum* KO9 koji je već dokumentiran kao probiotički soj i u nedavnom istraživanju pokazao je značajnu protuupalnu aktivnost u simuliranom modelu upale (Kostelac i sur., 2020).

5. ZAKLJUČAK

- Određena je sposobnost potencijalnih probiotičkih bakterija u uvjetima sline. Oba istraživana soja BMK pokazala su visoki stupanj preživljenja u uvjetima simulirane sline tijekom 24 sata eksperimenta. *L. plantarum* KO9 iskazao je veći stupanj preživljenja od 88 do 97 %.
- Određen je stupanj autoagregacije bakterija (*S. sanguinis*, *S. intermedius*, *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans*) te njihova koagregacija s ispitivanim BMK. Svi ispitivani sojevi iskazali su viši stupanj koagregacije s probiotičkim bakterijama te se time iskazao probiotički potencijal.
- Ispitana je sposobnost inhibicije biofilma bakterija uzročnika dentooralnih oboljenja u prisustvu supernatanta ispitivanih BMK. U većini slučajeva rezultati ukazuju da razrjeđenjem pada inhibitorni utjecaj supernatanta, uz iznimku inhibicije biofilma *Streptococcus intermedius* u prisustvu supernatanta *L. plantarum* M1 gdje je visoka inhibicija u svim uzorcima. Sumarno, *L. plantarum* M1 značajnije je inhibirao formaciju biofilma u svim uzorcima.

6. LITERATURA

1. Alok A., Singh I.D., Singh S., Kishore M., Jha P.C. i Iqubal M. A. (2017). Probiotics: A New Era of Biotherapy, *Advanced Biomedical Research* **(6)** 31.
2. Božanić R. i Tratnik LJ. (1999). Probiotički supstrati i bakterije mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **49** 27-46.
3. Caufield P.W., Dasanayake A.P., Yihong Li, Pan Y., Hsu J., i Hardin J.M., (2000). Natural History of *Streptococcus sanguinis* in the Oral Cavity of Infants. *Infection and immunity journal* **68(7)** 4018-4023.
4. Campana R, van Hemert S, Baffone W (2017) Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog* **(9)** 12.
5. Claridge J.E., Attori 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.
6. Daastor P. D., Patil R.U., Unde M.P., Patil S.S. (2018) Probiotics for life – Part I general health perspectives. *Journal od dental and allied sciences* **7(2)** 75-80.
7. Dewhirst F.E., Chen T, Izard J., Paster B.J., Tanner A.C.R., Yu W-H., Lakshmanan A. i Wade W.G (2010) The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology* **192(19)** 5002–5017.
8. Duplančić R. (2016) Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama s korištenih četkica za zube. Diplomski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu.
9. Frece, Jadranka. 2007. "Sinbiotički Učinak Bakterija: Lactobacillus Acidophilus M92, Lactobacillus Plantarum L4 i Enterococcus Faecium L3."
10. Frece, Jadranka, B. Kos, Jasna Beganović, Snježana Vuković, and Jagoda Šušković. 2005. "In Vivo Testing of Functional Properties of Three Selected Probiotic Strains." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21(8–9)** 1401–1408.

11. Frece, Jadranka, Blaženka Kos, Ivan Kreimir Svetec, Zoran Zgaga, Jasna Beganović, Andreja Leboš, and Jagoda Šušković. 2009. "Synbiotic Effect of Lactobacillus Helveticus M92 and Prebiotics on the Intestinal Microflora and Immune System of Mice." *Journal of Dairy Research* **76(1)** 98–104.
12. Forssten S. D., Bjorklund M. i Ouwehand A.C. (2010) Streptococcus mutans, caries and Simulation models. *Nutrients*. **2(3)** 290-298.
13. Glažar I., Ivančić-Jokić N., Bakarčić D., Mišković I., Kuiš D. (2013). Probiotici u dentalnoj medicini. *Medicina fluminensis* **50(3)** 306-310.
14. Gregurek LJ. (1999). Antimikrobno i antimutageno djelovanje probiotika. *Mljekarstvo* **49(4)** 255-260.
15. Goretić A. (2019). Antibiotici u dentalnoj medicini. Diplomski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
16. Haukioja, A., Yli-Knuuttila, H., Loimaranta, V., Kari, K., Ouwehand, A. C., Meurman, J. H., & Tenovu, J. (2006). Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral microbiology and immunology*, **21(5)** 326-332.
17. Hasslöf P. i Stecksén-Blicks C. (2020). Probiotic bacteria and dental caries. *Impact of Diet and Nutrition on Oral Health* **10** 99-107.
18. Isalm B.K.S., Khan A.U. (2007) Dental caries: from infection to prevention. *Medical Science Monitor* **13** 196–203.
19. 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.
20. Kachlany S.C., 2010. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin: from Threat to Therapy, *Journal of dental research* **89(6)** 561-570.
21. Kesić LJ., Petrović M., Obradović R. i Pejčić A. (2009). Značaj Aggregatibacter actinomycetemcomitans-a u etiologiji parodontalnih oboljenja. *Acta Medica Mediana* **48(3)** 35-37.

22. Kidd E.A.M., Fejerskov O. (2004) What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *Jornal of Dental Research* **83** 35–38.
23. 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.
24. Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimparaga M., Frece J. i Matošić S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **94** 981-987.
25. Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiology reviews* **50(4)** 353.
26. Montalto M., Vastola M., Marigo L., Covino M., Graziosetto R., Curigliano V., Santoro L., Cuoco L., Manna R. i Gasbarrini G. (2004) Probiotic Treatment Uncreases Salivary Counts of Lactobacilli: A Double-Blind Randomized, Controlled Study. *Digestion* **69** 53-56.
27. Najžar-Fleger D. i Prpić G. (1983). Mikroflora dentobakterijskog plaka iz aproksimalnih prostora. *Acta stomatologica Croatia* **17(4)** 279-282.
28. Paik S., Senty L., Das S., Noe J. C., Munro C. L., i Kitten T. (2005) Identification of Virulence Determinants for Endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by Signature-Tagged Mutagenesis. *Infection and immunity journal* **73(9)** 6064-6074.
29. Plančak D. i Aurer-Koželj J. (1988). Parodontne bolesti, dentalni karijes i stomatološka zaštita u stanovnika Zagreba. *Acta stomatologica croatica* **22(3)** 195-202.
30. Pramesti H. T. (2016). *Streptococcus sanguinis* as an opportunistic species in human oral cavity: adherence, colonization and invasion. *Padjadjaran Journal of dentistry* **28(1)** 45-52.
31. Raja M., Ummer F. i Dhivaker C.P., (2014). *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* – A Tooth Killer? *Journal of clinical and diagnostic research* **8(8)** 13-16.
32. Rogelj I. (1994). Lactic acid bacteria as probiotics. *Mljekarstvo* **44(4)** 277-284.
33. Scannapieco F.A., Bergey E.J., Reddy M.S. i Levine M.J. (1989) Characterization of salivary alpha amylase binding to *Streptococcus sanguinis*. *Infection and Immunity* **57(9)** 2853-2863.

34. Shellis R.P. i Dibdin G.H. (1988). Analysis of the buffering systems in dental plaque. *Journal of Dental Research* **67(2)** 438-446.
35. Spellerberg, B. and Brandt, C. (2015). *Streptococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology* **22** 383-403.
36. Sušac M. (2020) Utjecaj odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline na dentalne patogene. Završni rad, Repozitorij Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta u Zagrebu
37. Šušković J., Brkić B. i Matošić S. (1997). Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47 (1)** 57-73 .
38. Šurdilović D.S., Stojanović I. i Apostolović M. (2009). Salivarni dušikov oksid kao biomarker rizika za karijes kod djece. *Acta. Stomatol. Croata* **43(1)** 39-44.