

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Ana Šiljeg
0058219515

**PROBIOTIČKA I POSTBIOTIČKA SVOJSTVA VIŠESOJNOG PROBIOTIČKOG
PRIPRAVKA NA UZROČNIKE BOLESTI USNE ŠUPLJINE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: dr. sc. Deni Kostelac

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PROBIOTIČKA I POSTBIOTIČKA SVOJSTVA VIŠESOJNOG PROBIOTIČKOG PRIPRAVKA NA UZROČNIKE BOLESTI USNE ŠUPLJINE

Ana Šiljeg, 0058219515

Sažetak: Dentalne infekcije, uzrokovane bakterijama roda *Streptococcus* i kvascem *Candida albicans*, dovode do propadanja zuba i bolesti desni. Prevencija se temelji na sprječavanju stvaranja bakterijskih biofilмова. Probiotici mogu smanjiti rizik od karijesa i drugih oralnih bolesti. Ovo istraživanje ispitivalo je antimikrobnu aktivnost bakterija mliječne kiseline protiv dentalnih patogena, njihovu sposobnost formiranja biofilma te koagregaciju sa streptokokima i kvascom *Candidom albicans*. Rezultati su pokazali da bakterije mliječne kiseline, osim *Lacticaseibacillus paracasei*, imaju potencijal za formiranje biofilma. Supernatant bakterija mliječne kiseline snažno je inhibirao rast bakterije *Staphylococcus aureus*. Koagregacija streptokoka s bakterijom *Lacticaseibacillus rhamnosus* bila je posebno izražena, sugerirajući da probiotički pripravci mogu imati važnu ulogu u očuvanju oralnog zdravlja.

Ključne riječi: biofilmovi, antimikrobno, koagregacija, autoagregacija, dentalni patogeni

Rad sadrži: 31 stranica, 14 slika, 2 tablice, 41 literaturnih navoda,

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: dr. sc. Deni Kostelac

Datum obrane: 17. lipnja 2024. god.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate 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

PROBIOTIC AND POSTBIOTIC PROPERTIES OF A MULTI-STRAIN PROBIOTIC PREPARATION ON ORAL DISEASE PATHOGENS

Ana Šiljeg, 0058219515

Abstract: Dental infections, caused by bacteria of the genus *Streptococcus* and the yeast *Candida albicans*, lead to tooth decay and gum diseases. Prevention focuses on inhibiting the formation of bacterial biofilms. Probiotics can reduce the risk of cavities and other oral diseases. This study examined the antimicrobial activity of lactic acid bacteria against dental pathogens, their ability to form biofilms, and their coaggregation with streptococci and *Candida albicans*. The results showed that lactic acid bacteria, except *Lactocaseibacillus paracasei*, have the potential to form biofilms. The supernatant of lactic acid bacteria strongly inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*. Coaggregation of streptococci with *Lactocaseibacillus rhamnosus* was particularly pronounced, suggesting that probiotic preparations could play an important role in maintaining oral health.

Keywords: biofilms, antimicrobial, coaggregation, autoaggregation, dental pathogens

Thesis contains: 31 pages, 14 figures, 2 tables, 41 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Deni Kostelac, PhD

Thesis defended: June 17, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. BOLESTI/OBOLJENJA ZUBI I USNE ŠUPLJINE	3
2.2. MEHANIZMI NASTANKA KARIJESA	3
2.3. UTJECAJ MIKROBIOTE NA NASTANAK OBOLJENJA ZUBA	4
2.4. <i>CANDIDIJAZA</i>	5
2.5. BIOFILMOVI UZROČNIKA KARIJESA I <i>CANDIDIJAZE</i>	5
2.6. STRATEGIJE U PREVENCIJI I LIJEČENJU NAJČEŠĆIH OBOLJENJA ZUBA I USNE ŠUPLJINE	8
2.7. ULOGA PROBIOTIKA I POSTBIOTIKA	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. MIKROORGANIZMI	11
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE I KEMIKALIJE	11
3.1.2.1 ODRŽAVANJE I UZGOJ MIKROORGANIZAMA	12
3.1.2.3. KEMIKALIJE	12
3.1.3. APARATURA I PRIBOR	12
3.2. METODE RADA	13
3.2.1. UZGOJ MIKROORGANIZAMA	13

3.2.2. PRIPREMA RADNIH SUSPENZIJA MIKROORGANIZAMA.....	13
3.2.3. PRIPREMA VIŠESOJNIH SUSPENZIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	14
3.2.4. DOBIVANJE POSTBIOTIČKIH FRAKCIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	14
3.2.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST DOBIVENIH IZOLATA BAKTERIJA RODA <i>BACILLUS</i> 14	
3.2.6. SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMOVA BAKTERIJSKIH IZOLATA.....	15
3.2.7. AUTOAGREGACIJA	16
3.2.8. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI KOAGREGACIJE IZOLATA S ODABRANIM PATOGENIMA.....	16
3.2.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST DOBIVENIH IZOLATA BAKTERIJA RODA <i>BACILLUS</i> . 17	
4.2. KVANTIFIKACIJA SPOSOBNOSTI FORMIRANJA BIOFILMOVA.....	18
4.3. KOAGREGACIJA DENTALNIH PATOGENA RODA <i>STREPTOCOCCUS</i> S PROBIOTIČKIM BAKTERIJAMA MLIJEČNE KISELINE	20
4.4. AUTOAGREGACIJA DENTALNIH PATOGENA TE KVASCA <i>C.ALBICANS</i> U PRISUTNOSTI <i>LACTOBACILLUS</i> VRSTA.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	27
6. POPIS LITERATURE.....	28

1. UVOD

Dentalne infekcije su među najčešćim bakterijskim infekcijama kod ljudi, često dovode do propadanja zuba i periodentalnih oboljenja. Stručnjaci smatraju da nakupljanje bakterija na zubima, poznato kao dentalni plak, uzrokuje kvarenje zuba i bolesti desni. Stoga bi prevencija trebala biti usmjerena na sprječavanje nastanka ovih bakterijskih biofilmova (Loesche, 1986).

Usna šupljina heterogeni je okoliš, sastoji se od velikog broja fizičkih dijelova (nepce, jezik, gornja i donja čeljust), svaki dio usne šupljine potiče razvoj drugačijih vrsta mikroorganizama. Među najčešćim bolestima organa usne šupljine su karijes zuba, jedna od najučestalijih bolesti kod ljudi i paradontitis, koji je upala parodonta. Na zdravlje oralne sluznice utječu brojni faktori, uključujući genetske predispozicije, prisustvo mikroorganizama u usnoj šupljini i, u velikoj mjeri, loša oralna higijena. Dominantni patogeni u dentooralnom sustavu su bakterije roda *Streptococcus*, koje se mogu podijeliti u četiri grupe prema biokemijskim, fiziološkim i genetskim razlikama. Te grupe uključuju: mutans vrste (*S. mutans*), koje su povezane s karijesom i dentalnim plakom; mitis vrste (*S. sanguis*), koje su prisutne u dentalnom plaku; salivarius vrste (*S. salivarius*), koje se uglavnom vezuju uz mukozna tkiva usne šupljine; te anginosus vrste (*S. intermedius*), koje su uglavnom prisutne u gingivalnim šupljinama (McBain i sur., 2009). Osim bakterija, određene vrste gljivica također mogu doprinijeti dentalnim oboljenjima. Jedna od tih vrsta je *Candida albicans*, koja je često povezana s razvojem prostetskog stomatitisa, bolesti koja se javlja kod korisnika mobilnih zubnih nadomjestaka (Lamfon i sur., 2003).

Istraživanja su pokazala da probiotici mogu imati potencijal u smanjenju rizika od razvoja karijesa, paradontitisa i drugih bolesti usne šupljine (Smith i sur., 2020). Primjena određenih sojeva probiotičkih bakterija može pomoći u održavanju ravnoteže mikroorganizama u usnoj šupljini, smanjenju rasta patogenih bakterija te jačanju imunološkog odgovora (Jones i sur., 2019). Postbiotici, s druge strane, mogu imati svoje prednosti jer ne zahtijevaju unošenje živih mikroorganizama. Umjesto toga, koriste se proizvodi metabolizma probiotičkih mikroorganizama ili njihovi molekularni sastojci koji imaju korisne učinke na zdravlje (Lee i sur., 2021).

Cilj ovog istraživanja je bio analizirati antimikrobnu aktivnost supernatanta bakterija mliječne kiseline protiv dentalnih patogena, istražiti sposobnost formiranja biofilma odabranih dentalnih patogena i potencijalnih probiotičkih bakterija mliječne kiseline, te istražiti autoagregaciju

streptokoka i kvasca *Candida albicans* s bakterijama mliječne kiseline, kao i koagregaciju streptokoka s bakterijama mliječne kiseline. Ova istraživanja imaju za cilj pružiti vrijedne uvide u mikrobne interakcije u usnoj šupljini, s potencijalnom primjenom u razvoju novih terapijskih strategija za očuvanje oralnog zdravlja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bolesti/oboljenja zubi i usne šupljine

Neki od prilično čestih simptoma bolesti oralne šupljine koji upućuju na narušenu ravnotežu unutar oralne šupljine su na prvome mjestu neugodan osjećaj peckanja oralne sluznice, bol unutar oralne šupljine, narušena osjetila okusa unutar oralne šupljine, suhoća sluznice unutar usta, peckanje u ustima i drugi. Mnoge bolesti usne šupljine kao što su na primjer karijes ili paradontoza u konačnici vode do brojnih opasnih bolesti cjelokupnoga organizma. Mogu dovesti do šećerne bolesti, bolesti srca, respiratornih bolesti, prijevremenog porođaja, manje tjelesne mase kod novorođenčadi i druge bolesti (Jeffcoat i sur., 2001).

2.2. Mehanizmi nastanka karijesa

Definicija karijesa, koju je dao prof. Loesche ukazuje na mjere za uspješnu prevenciju ovog oboljenja: „Zubni karijes je kronična, kompleksna bakterijska infekcija, koja rezultira miligramskim gubicima minerala iz zuba koji je zahvaćen infekcijom. Usprkos višefaktorskoj prirodi ove infekcije, glavni uzročnici su bakterije i navike u ishrani, koje omogućuju da se bolest razvije i kao takva prepoznata” (Loesche, 1994.). Karijes nastaje spajanjem četiri čimbenika: zubna ploha (domaćin), mikroorganizam (uzročnik), okolina (supstrat mikroflora) te vrijeme koje je potrebno za stvaranje karijesa. Bakterija imena *Streptococcus mutans* smatra se jednim od najčešćih uzročnika karijesa ali pri samom nastanku sudjeluju i mnogi drugi mikroorganizmi poput *Lactobacillus* i *Actinomyces*.

Karijes nastaje kada se mikroorganizmi naseljavaju na površini zuba, stvarajući tanak sloj hrane i bakterija što možemo vidjeti na slici 1. Bakterije koriste šećer kao izvor hrane i s vremenom ga pretvaraju u kiselinu koja prodire u zubnu caklinu. Ako se ne održava redovita oralna higijena, kiselina sve više oštećuje caklinu, što dovodi do nastanka karijesa. U tom stadiju, karijes se može liječiti ili usporiti, ali ako se ne liječi uz stručnu pomoć stomatologa, napreduje i stvara šupljinu unutar zuba kroz koju mikroorganizmi prodiru dublje (Lakshman, 2006).



Slika 1. Faze nastanka karijesa (prema Poliklinika Smile, 2018)

Ova bolest je najrasprostranjenija među kroničnim bolestima koje pogađaju ljude. Izvorna teorija koja još uvijek prevladava i objašnjava proces bolesti implicira ugljikohidrate, oralne mikroorganizme i kiseline kao glavne čimbenike u procesu karijesa. To je kemijsko-parazitski proces koji se sastoji od dvije faze: dekalifikacije cakline, što rezultira njenim potpunim uništenjem, i dekalifikacije dentina (Selwitz i sur., 2007).

2.3. Utjecaj mikrobiote na nastanak oboljenja zuba

Pojam "mikrobiom" uveo je Joshua Lederberg i odnosi se na zajednicu simbiotskih, komenzalnih i patogenih mikroorganizama (Deo i Deshmukh, 2019). Sastav i interakcije bilo kojeg mikrobioma doprinose općem zdravlju, a posebno su ključni za zdravlje usne šupljine (Mahasneh, 2019). Usna šupljina je kolonizirana karakterističnom i složenom mikrobiotom koja raste kao raznoliki biofilm na svim sluzničkim i zubnim površinama (Thuy i sur., 2017). U usnoj šupljini postoji više od 700 vrsta bakterija, gljivica, virusa, arheobakterija i protozoa (Belibasakis, 2018). Bakterije su najviše istraživani mikroorganizmi u usnoj šupljini, no samo 57 % bakterijskih vrsta u usnoj šupljini je službeno imenovano. Kod zdravih osoba, oralna mikroflore uglavnom se sastoji od fakultativno anaerobnih gram-pozitivnih bakterija (Bartnicka i sur., 2020). Oralna mikrobiota obično živi u harmoniji s domaćinom i pruža važne koristi koje doprinose općem zdravlju. Mikroorganizmi u oralnim biofilmovima ne postoje kao pojedinačne stanice, već žive u bliskoj međusobnoj blizini (Nobs i Jenkinson, 2015). Osim toga, oralno okruženje utječe na sastav mikrobioma. Ako dođe do promjena u lokalnim uvjetima, one mogu utjecati na interakcije između mikroorganizama u ustima i povećati rizik od parodontnih bolesti (Greenwood i sur., 2020).

Oralni gljivični mikrobiom (mikobiom) značajna je komponenta oralnog mikrobioma. Rod *Candida* prisutan je kod otprilike 25–75 % zdravih pojedinaca kao komenzalni organizam. *Candida albicans* je jedna od najvažnijih, najčešćih gljivičnih vrsta. Pod određenim, povoljnim

uvjetima, vrste *Candida*, kao oportunistički patogeni, mogu uzrokovati infekcije usne sluznice (Jorgensen i sur., 2017).

2.4. Candidijaza

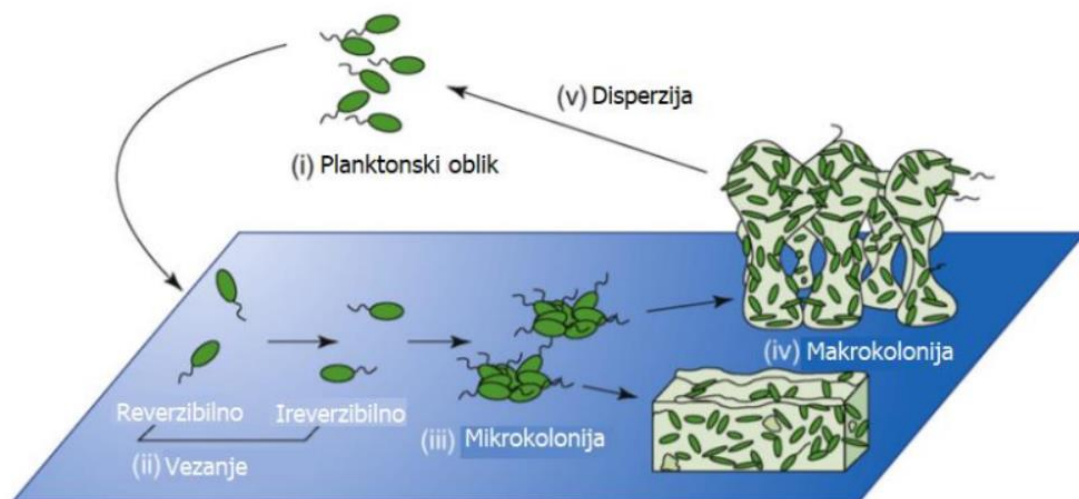
Oralna kandidijaza je najčešća gljivična infekcija usne šupljine uzrokovana prekomjernim rastom vrsta *Candida*, pri čemu je najčešća *Candida albicans*. U općoj populaciji, stope nošenja kandidijaze prijavljene su da se kreću od 20 % do 75 % bez ikakvih simptoma. Incidencija *C. albicans* izolirane iz usne šupljine prijavljena je u 45 % novorođenčadi, 45 %–65 % zdrave djece, 30 %–45 % zdravih odraslih, 50 %–65 % ljudi koji nose mobilne proteze, 65 %–88 % onih koji borave u akutnim i dugotrajnim ustanovama za njegu, 90 % pacijenata s akutnom leukemijom koji su podvrgnuti kemoterapiji, i 95 % pacijenata s HIV-om (Epstein 1990). *C. albicans* je normalan komenzal usta i općenito ne uzrokuje probleme kod zdravih ljudi. Incidencija varira ovisno o dobi i određenim predisponirajućim čimbenicima. Postoje tri šire grupe koje obuhvaćaju akutnu kandidijazu, kroničnu kandidijazu i kutni heilitis. Čimbenici rizika uključuju poremećenu funkciju žlijezda slinovnica, lijekove, proteze, prehranu bogatu ugljikohidratima, ekstreme u dobi, pušenje, dijabetes melitus, Cushingov sindrom, malignitete i imunosupresivna stanja. Upravljanje uključuje uzimanje anamneze, pregled i odgovarajuće antifungalno liječenje.

C. albicans stvara biofilmove na abiotičkim ili biotičkim površinama. Kateteri, proteze (abiotičke) i površine sluzničnih stanica (biotičke) najčešći su supstrati (Fanning, 2012). Biofilmovi se formiraju kroz sekvencijalni proces koji uključuje prianjanje kvasnih stanica na supstrat, proliferaciju tih kvasnih stanica, formiranje hijfalnih stanica u gornjem dijelu biofilma, akumulaciju ekstracelularnog matriksa i, konačno, disperziju kvasnih stanica iz biofilmskog kompleksa. Zreli biofilmovi su mnogo otporniji na antimikrobne agense i faktore imunološkog sustava domaćina (Finkel, 2011).

2.5. Biofilmovi uzročnika karijesa i kandidijaze

Biofilmovi su zajednice višestaničnih mikroorganizama koje drži zajedno ekstracelularni matriks koji oni sami proizvode. Precizna struktura, sastav i fiziologija biofilma ovise o vrsti mikroorganizama koji ga čine, dok vrsta ekstracelularnog matriksa doprinosi njegovoj organizaciji (Lopez i sur., 2010). Molekularni mehanizmi koji reguliraju formiranje biofilмова razlikuju se među različitim vrstama. Ipak, postoje određene karakteristike koje su zajedničke svim vrstama biofilмова (Monds i O'Toole, 2009). Na primjer, svi biofilmovi sadrže ekstracelularni matriks koji je uglavnom sastavljen od polisaharida, uz prisutnost proteina i

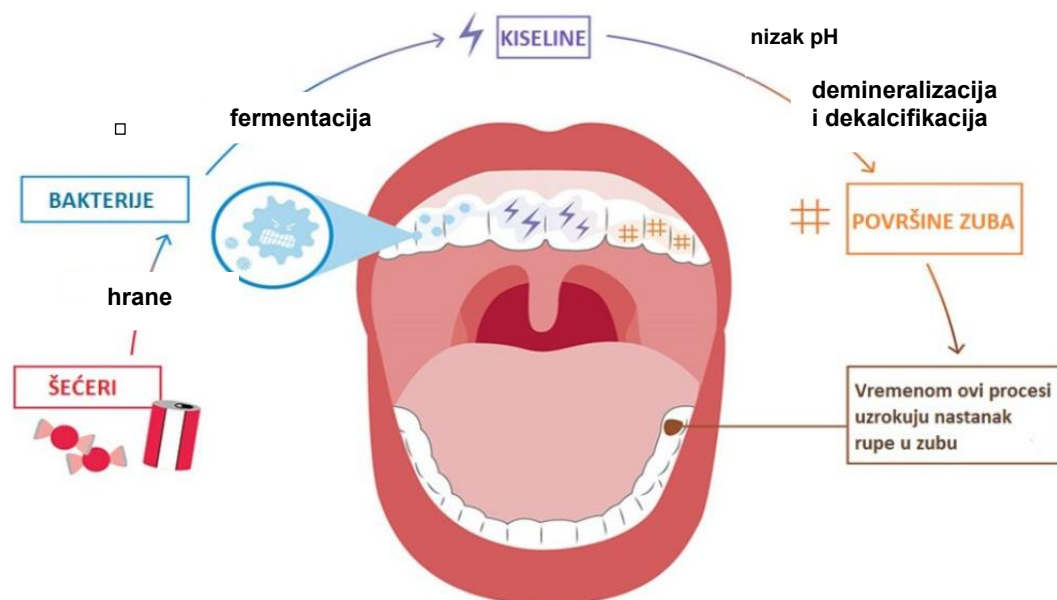
DNA molekula. Priroda egzopolisaharidnog matriksa ovisi o uvjetima uzgoja, mediju i supstratu na kojem se uzgajaju. Kisik je ključna molekula koja sudjeluje u rastu i razvoju biofilma te u njegovoj metaboličkoj aktivnosti. Sposobnost kisika da difundira do unutrašnjih dijelova biofilma od presudne je važnosti za metaboličku aktivnost mikroorganizama koji se nalaze u tim dijelovima biofilma. Nastajanje biofilma prikazano je na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz stvaranja biofilma - Nastajanje biofilmova opisano je kroz nekoliko koraka- (i) pokretne jedinice bakterija (ii) vežu se na podlogu, nakon čega nastaju (iii) mikrokolonije iz kojih se razvijaju sustavi (iv) makrokolonija. Pojedini dijelovi makrokolonije se mogu odvojiti (v) (dispergirati) te stvoriti novu koloniju organiziranu u obliku biofilma. (prema Monds i O'Toole, 2009)

Formiranje biofilma na potpuno čistim zubima započinje stvaranjem zubne opne. Ova opna sastoji se od proteina koji se iz cijele usne šupljine adsorbiraju na površinu zuba. Elektrostatske interakcije igraju važnu ulogu u procesu adsorpcije i formiranja proteinske zubne opne. Molekule koje sudjeluju u ovom procesu uključuju različite fosfoproteine, statherin, histatin, visokomolekularne glikoproteine, amilaze, lizozim i laktoferin (Jäsberg, 2017). Opna se na svježe opranim zubima stvori unutar 20 minuta (Vacca Smith i Bowen, 2000). Vezanje 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 zatim vežu, kao primjer je vezanje određenih bakterija na α -amilazu, enzim koji je prisutan u usnoj šupljini. Biofilm karijesa je kompleksna zajednica mikroorganizama koja se formira na površini zuba i igra ključnu ulogu

u razvoju karijesa. Ovaj biofilm, poznat i kao plak, sastoji se od bakterija, gljivica, proteina i polisaharida koji se zajedno nalaze na zubima. Bakterije u biofilmu metaboliziraju ugljikohidrate iz hrane i proizvode organske kiseline kao nusprodukt, što dovodi do pada pH vrijednosti u okolini zuba. Kiselost koja nastaje može izazvati demineralizaciju tvrdih zubnih tkiva, što je početak procesa stvaranja karijesa (Vacca Smith i Bowen 2000). Nastajanje biofilma karijesa je prikazano na slici 3.

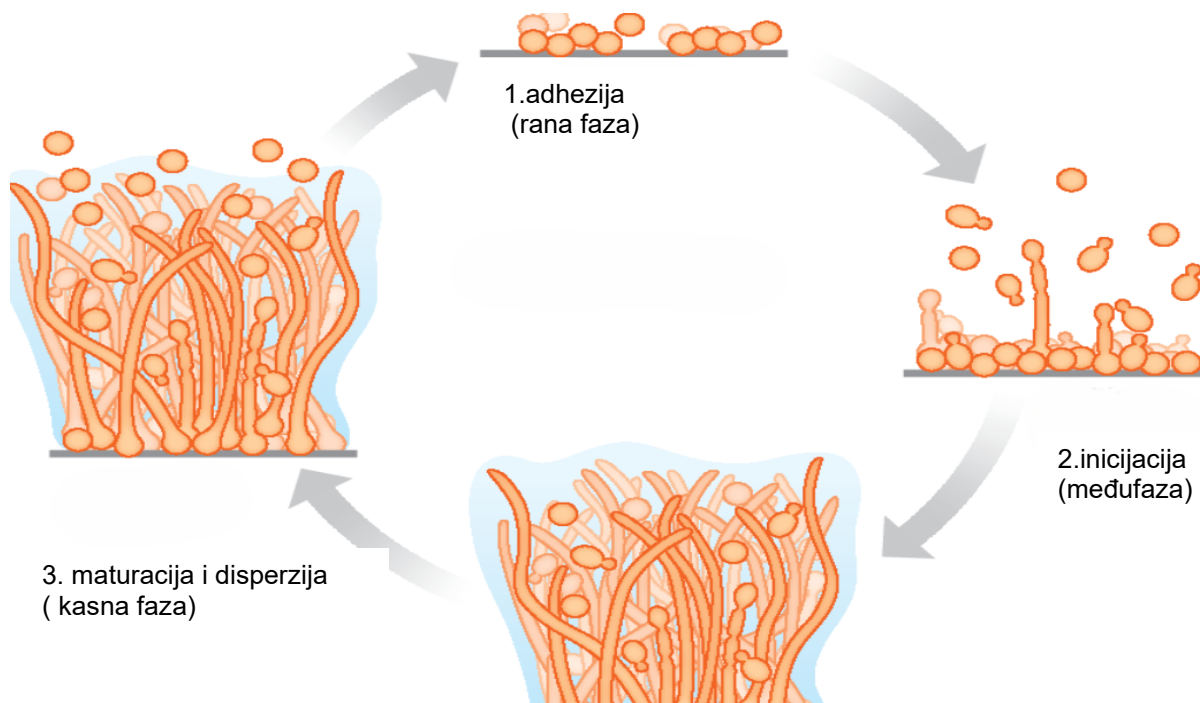


Slika 3. Nastajanje biofilma karijesa (prema Zubarolog, 2020)

Neki od glavnih mikroorganizama u biofilmu karijesa uključuju *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius* i *Lactobacillus acidophilus*. Ovi mikroorganizmi su povezani s razvojem karijesa i imaju sposobnost stvaranja kiselina koje oštećuju zubnu caklinu (Bowen, 2016).

Candida albicans koristi adhezine, specijalizirane molekule koje im omogućavaju da se pričvrste za epitelne stanice u usnoj šupljini ili za zubne površine. Nakon početnog pričvršćivanja, gljivice počinju stvarati slojeve stanica koje su međusobno povezane egzopolisaharidnim matriksom. Ovaj matriks se sastoji od polisaharida, proteina i DNA koji štite stanice unutar biofilma od vanjskih prijetnji, uključujući antifungalne lijekove. Za formiranje in vitro biofilma *C. albicans-a*, rana faza traje otprilike 11 sati, što dovodi do formiranja različitih mikrokolonija. Međufaza formiranja biofilma može trajati 12–30 sati, karakterizirana formiranjem dvostrukog sloja obično sastavljenog od kvasca, klica i/ili mladih hifa. Nakon ove faze, sazrijevanje biofilma *C. albicans-a* uključuje razvoj debelog sloja u kojem su prisutni kvasci i hife, tvoreći gustu mrežu. Proces sazrijevanja obično traje otprilike 38–72 sata (Seneviratne i sur., 2008). Nakon

sazrijevanja dolazi do faze raspršivanja, gdje zreli biofilm otpušta pupoljaste kćerke stanica kao neprijanjajuće kvasne stanice kako bi se proširila kolonizacija/infekcija (Mitchell i Blankenship, 2006). Nastajanje biofilma *Candida albicans* možemo vidjeti na slici 4.



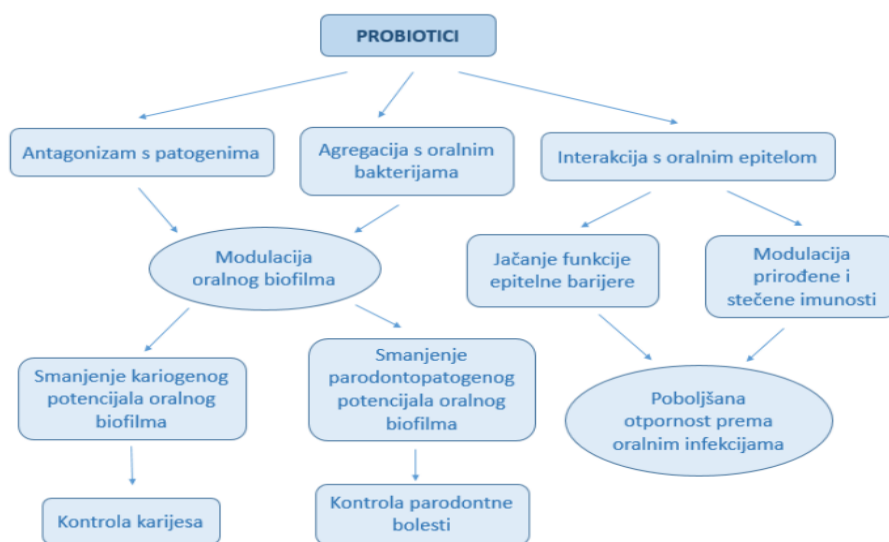
Slika 4. Nastajanje biofilma *Candida albicans* (prema Nobile i Johnson, 2015)

2.6. Strategije u prevenciji i liječenju najčešćih oboljenja zuba i usne šupljine

Prevencija bolesti usne šupljine ključna je za očuvanje oralnog zdravlja i opće dobrobiti. Strategije prevencije uključuju niz mjera koje se mogu primijeniti na individualnoj i zajedničkoj razini. Nekoliko ključnih strategija su: redovita oralna higijena (pranje zuba, četkanje jezika), profesionalna oralna higijena (posjeti stomatologu), zdrava prehrana te korištenje fluorida. Prevencija karijesa i parodontalnih bolesti podrazumijeva pravilno i redovno pranje zuba i usne šupljine, uz redovne posjete stomatologu, jer zubni kamenac i eventualne bolesti može liječiti samo stomatolog (Jurić i sur., 2003). Na raspolaganju postoje brojna sredstva za održavanje oralne higijene, a dostupna su i sredstva za fluorizaciju. Pravilnom i adekvatnom upotrebom preparata fluora može se smanjiti početno oštećenje (karijesna lezija), što se preporučuje i u tretmanu preosjetljivih zuba. Za održavanje higijene svih zubnih površina mogu se koristiti i pomoćna sredstva kao što su zubni konac, interdentalni konusi, različite rastvori za ispiranje i sl. (Chung i sur. 2006).

2.7. Uloga probiotika i postbiotika

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). Djeluju tako da prijanjaju za zube, zubni plak i meke naslage te luče antimikrobne metabolite i kiseline koje mjenjaju okoliš. Probiotici koji se koriste u liječenju dostupni su u obliku pastila, tekućina za ispiranje i pasta za zube. Dosadašnje studije pokazuju da probiotici ne mogu zamijeniti uništenu sluzničnu floru, ali kao privremene kolonije mogu pomoći organizmu obavljanjem funkcija prirodne flore, omogućujući pritom prirodnoj flori da se oporavi. Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina bakterija koje se najčešće klasificiraju kao probiotici. Njihova glavna karakteristika je metaboličko svojstvo da šećere (heksoze) oksidiraju do mliječne kiseline. Iako su probiotici novo područje istraživanja u dentalnoj medicini i pokazuju ohrabrujuće rezultate, potrebno je još mnogo kliničkih istraživanja prije nego što postanu dio standardne prakse u dentalnoj medicini i prevenciji oralnih bolesti. Djelovanje probiotika je prikazano na slici 5.



Slika 5. Potencijalni mehanizmi djelovanja probiotika u usnoj šupljini (prema Stamatova i Meurmann, 2009)

Postbiotik se definira kao pripravak neživih mikroorganizama i njihovih komponenata koji pruža zdravstvenu korist domaćinu. Postignut je konsenzus u nekoliko točaka, kao što su: 1) to je namjerno inaktivirana mikrobna stanica koja može koristiti domaćinu, s ili bez njezinih metabolita ili staničnih komponenata, 2) ne mora potjecati od probiotika da bi inaktivirana

verzija bila prepoznata kao postbiotik, i 3) postbiotici se moraju primjenjivati na površinama domaćina i ciljnim organima, a nisu ograničeni na crijeva (Salminen i sur., 2021). Primjeri postbiotičkih tvari su kratkolančane masne kiseline i komponente kao što su mikrobne frakcije, funkcionalni proteini, izlučeni polisaharidi, ekstracelularni polisaharidi (EPS), stanični lizati, teikoinjska kiselina, muropeptidi iz peptidoglikana i mnogi drugi. Unatoč tome što nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi koji stoje iza zdravstvenih koristi postbiotika, znanstveni podaci su pružili dokaze da postbiotici posjeduju različita funkcionalna svojstva, uključujući, ali ne ograničavajući se na antimikrobna, antioksidativna i imunomodulatorna svojstva (Zhong i sur., 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Iz komercijalnih zbirki mikroorganizama (The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH i American Type Culture Collection) pribavljeni su standardni sojevi test-mikroorganizama korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti, inhibiciju biofilmova, koagregaciju i autoagregaciju:

Candida albicans ATCC®10231™

Escherichia coli ATCC®25922™

Staphylococcus aureus ATCC®25923™

Salmonella typhimurium ATCC®29631™

Listera monocytogenes ATCC®23074™

Bakterije mliječne kiseline, potencijalni probiotički kandidati, korišteni u ovom istraživanju također su nabavljeni iz navedenih zbirki:

Lactocaseibacillus rhamnosus DSM 20021

Limosilactobacillus reuteri DSM 20016

Lactocaseibacillus paracasei subsp. *paracasei* DSM 4905

Sljedeći streptokoki, također iz komercijalnih zbirki i korišteni u istraživanju, su:

Streptococcus mutans DSM®20523™

Streptococcus intermedius DSM®20573™

3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije

Za uzgoj bakterija mliječne kiseline korišten je MRS bujon (de Man, Rogosa i Sharpe bujon). Patogeni streptokoki su uzgajani u M17 bujonu, dok je za uzgoj kvasca *Candida albicans* korišten sladni bujon.

3.1.2.1 Održavanje i uzgoj mikroorganizama

- ❖ MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava: pepton 10,0 g L⁻¹; goveđi ekstrakt 10,0 g L⁻¹; ekstrakt kvasca 5,0 g L⁻¹; glukoza 20,0 g L⁻¹; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g L⁻¹; natrijev acetat 5,0 g L⁻¹; amonijev citrat 2,0 g L⁻¹; magnezijev sulfat 0,2 g L⁻¹; manganov sulfat 0,05 g L⁻¹; agar 15,0 g L⁻¹; Tween 80 1,0 g L⁻¹; pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija pri 121 °C/15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promješan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.
- ❖ MRS bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodanog agara. Sterilizacija se provela pri 121 °C/15 min.
- ❖ M17 agar (Biolife, Italija) sastava: pepton iz kazeina 2,5 g L⁻¹; pepton 2,5 g L⁻¹; sojin pepton 2,5 g L⁻¹; kvaščev ekstrakt 5 g L⁻¹; goveđi ekstrakt 5 g L⁻¹; natrijev glicerofosfat 19 g L⁻¹; magnezijev sulfat 0,25 g L⁻¹; askorbinska kiselina 0,5 g L⁻¹; laktoza 5 g L⁻¹; agar 13 g L⁻¹. pH vrijednost podloge je 7,1; sterilizacija pri 121 °C/15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi, dobro promješan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.
- ❖ M17 bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao M17 agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/15 min.
- ❖ Sladni agar sastava: sladni ekstrakt (praškasti) 20 g L⁻¹; pepton 6 g L⁻¹; glukoza 20 g L⁻¹; agar 15 g L⁻¹; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min.
- ❖ Sladni bujon sastava istog kao sladni agar, samo bez dodatka agara.

3.1.2.3. Kemikalije

- ❖ kristal-violet 1 % otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ octena kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- ❖ MRS bujon (De man, Rogosa i Sharpe) (Biolife, Milan, Italy)
- ❖ M17 bujon (Biolife, Milan, Italy)
- ❖ Sladni bujon (Biolife, Milan, Italy)

3.1.3. Aparatura i pribor

- ❖ automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ❖ centrifuga, 5424R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ❖ centrifuga, Centric 150 (Tehnica, Železniki, Slovenija)

- ❖ centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- ❖ čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- ❖ Eppendorf tubice (2ml)
- ❖ Erlenmeyerove tikvice
- ❖ hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- ❖ inkubator, MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Njemačka)
- ❖ kivete (50 ml)
- ❖ laboratorijske čaše
- ❖ laboratorijski stalci
- ❖ mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- ❖ mikrotitarske pločice s 96, 24 i 12 jažica (Falcon, SAD)
- ❖ plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- ❖ tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)

3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj mikroorganizama

Korišteni mikroorganizmi uzgajani su prekončno (24 sata) na prikladnim hranjivim podlogama na temperaturi od 37 °C za bakterije *Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius*, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lactocaseibacillus paracasei*, dok je temperatura za uzgoj kvasca *Candida albicans* bila postavljena na 28°C. Ovaj period inkubacije omogućio je mikroorganizmima da se adekvatno razmnože i formiraju kolonije na hranjivim podlogama, što je ključno za daljnje eksperimentalno istraživanje.

3.2.2. Priprema radnih suspenzija mikroorganizama.

Nakon prekončnog uzgoja u hranjivom bujonu, bakterijske stanice odvojene su od hranjive podloge centrifugiranjem pri 6000 okretaja min⁻¹ u trajanju od 15 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen, a istaložene stanice resuspendirane su u 9 mL sterilne deionizirane vode, te ponovno centrifugirane u istim uvjetima. Postupak ispiranja sterilnom vodom ponovljen je dva puta te su se nakon ispiranja istaložene stanice resuspendirale u 10 mL sterilne vode formirajući radnu suspenziju stanica.

3.2.3. Priprema višesojnih suspenzija bakterija mliječne kiseline

Nakon prekonoćnog uzgoja bakterija roda *Bacillus*, bakterijske stanice su odvojene od hranjive podloge centrifugiranjem pri 6000 okretaja min⁻¹ tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a talogu bakterija je dodano po 4 ml deionizirane vode. Svaka kiveta s talogom je temeljito homogenizirana. Nakon homogenizacije, sadržaj svih kiveta je spojen u jednu kivetu.

3.2.4. Dobivanje postbiotičkih frakcija bakterija mliječne kiseline

Nakon homogenizacije, dobivene suspenzije bakterija mliječne kiseline spojene su u jednu kivetu i stavljene u vodenu kupelj zagrijanu na 90 °C tijekom 10 minuta. Toplinska obrada dovodi do inaktivacije bakterijskih stanica, čime se zaustavlja njihov rast i metabolička aktivnost. Visoka temperatura uzrokuje denaturaciju proteina, razgradnju staničnih membrana i oštećenje genetskog materijala unutar stanica.

3.2.5. Antimikrobna aktivnost dobivenih izolata bakterija roda *Bacillus*

Antimikrobna aktivnost supernatanta određena je na polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica prilagođenim postupkom prema Frece i sur. (2011) i Ratsep (2014). Određena je antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline i supernatanta uzgojnog medija na bakterije *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™ i *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ te kvasac *Candida albicans* ATCC®10231™.

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 140 µL ispitivanog supernatanta bakterija mliječne kiseline, 130 µL medija za patogene (hranjivi bujon, uz iznimku sladnog bujona za kvasac *Candida albicans*) te su inokulirane s 10 µL prethodno uzgojenog ispitivanog test-mikroorganizma. Provedena je inkubacija na 37 °C tijekom 24 sati te je u intervalima mjerena apsorbancija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Praćen je rast u navedenom razdoblju te je izračunata inhibicija pomoću izraza:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad [1]$$

gdje je: A_t = apsorbancija u vremenu t

A_0 = apsorbancija u vremenu 0

Kontrolni uzorci su umjesto supernatanta sadržavali neinokulirani MRS bujon tretiran isto kao i ostali uzorci, a slijepe probe bili su uzorci bez dodatka patogenih mikroorganizama.

3.2.6. Sposobnost formiranja biofilmova bakterijskih izolata

Sposobnost formiranja biofilmova određena je prema metodi opisanoj u Kostelac i sur. (2021). Ispitivani izolati bakterija roda *Bacillus* klasificirani su prema jačini biofilmova formiranih nakon inkubacije.

U polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 12 jažica dodano je 2 mL hranjivog bujona. Uzorci su naciepljeni sa 100 μ L suspenzije prethodno uzgojenih bakterijskih kultura te su pločice inkubirane na 37 °C tijekom 24 h. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je ispražnjen pažljivim pipetiranjem kako bi se izbjeglo grebanje dna jažica. Nastali talog bakterijskih stanica ispran je s 2 mL sterilne vode uz lagano miješanje. Preostale stanice (adhezirane u biofilm) fiksirane su dodatkom 2 mL metanola te inkubacijom tijekom 15 min. Nakon fiksiranja, metanol je uklonjen i pločice su osušene na zraku. Adhezirane stanice obojane su dodatkom 1 %-tnog kristal violeta tijekom 5 min, te je višak boje uklonjen temeljitim ispiranjem deioniziranom vodom. Dodatkom 2 mL 33 % octene kiseline otpuštena je vezana boja te je mjerena optička gustoća (OD) pri 620 nm pomoću spektrofotometra. Neinkulirani uzorci korišteni su kao negativna kontrola.

Dobivene vrijednosti optičke gustoće uspoređene su s optičkom gustoćom negativne kontrole (ODC). Korišteni sojevi potom su klasificirani prema Borges i sur. (2012), a klasifikacije su prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija formacije biofilmova usporedbom optičke gustoće uzorka i negativne kontrole (*prema* Borges i sur. 2012)

Usporedba OD i ODC vrijednosti	Klasifikacija proizvodnje biofilma
$OD < ODC$	nema formacije biofilma
$ODC < OD < 2 \times ODC$	slaba formacija biofilma
$2 \times ODC < OD \leq 4 \times ODC$	umjerena formacija biofilma
$4 \times ODC < OD$	jaka formacija biofilma

3.2.7. Autoagregacija

Stupanj autoagregacije određen je prema metodama Kos i sur. (2003), s izmjenom metode Kostelac i sur. (2015). Provedeno je mjerenje apsorbancije pri 620 nm gornjeg sloja suspenzija u intervalima od 1 i 24 sata te je mjerenje modificirano na OD vrijednosti $0,5 \pm 0,05$ kako bi se standardizirao broj bakterijskih stanica kroz 24 sata. Stopa autoagregacije izračunata je prema formuli:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad (2)$$

gdje je A_t apsorbancija u vremenu t , a A_0 apsorbancija u vremenu 0

3.2.8. Određivanje sposobnosti koagregacije izolata s odabranim patogenima

Za određivanje stupnja koagregacije, pomješani su jednaki volumeni suspenzija bakterija mliječne kiseline i suspenzija odabranih test-mikroorganizama. Test-mikroorganizam koji je korišten u ovom ispitivanju je *Candida albicans* ATCC®10231™.

Pažljivo uzorkovanje s vrha pripremljenih suspenzija u mirovanju provodilo se tijekom 24 sata inkubacije na 37 °C, mjerenje apsorbancije provedeno je ekvivalentno prethodno opisanoj metodi autoagregacije.

3.2.9. Statistička obrada podataka

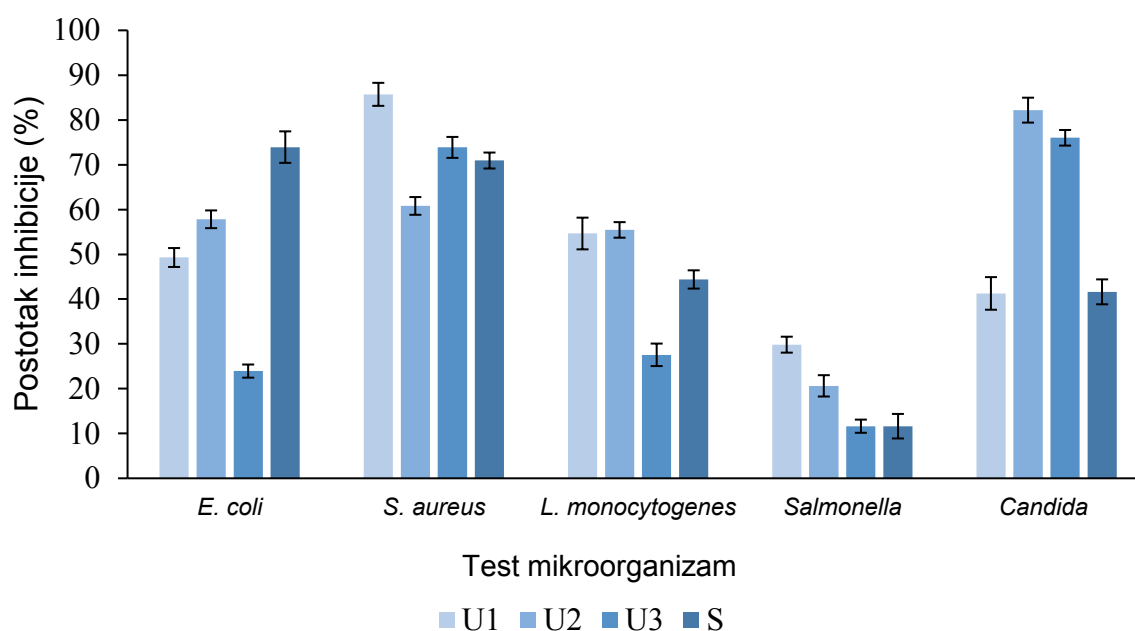
Rezultati eksperimanata izraženi su kao srednje vrijednosti ponovljenih eksperimenata \pm standardna devijacija. Statističke razlike među ponavljanjima određene su t-testom, a usporedbe među grupama provede su korištenjem ANOVA testa. Statistička značajnost podešena je na $p < 0,05$ te su sve usporedbe rađene pomoću programa Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određena je antimikrobna aktivnost supernatanta bakterija mliječne kiseline na dentalne patogene, kao i sposobnost formiranja biofilma odabranih dentalnih patogena i potencijalnih probiotičkih bakterija mliječne kiseline. Dodatno, istražena je autoagregacija streptokoka i kvasca *Candida albicans* s bakterijama mliječne kiseline te koagregacija streptokoka i bakterija mliječne kiseline. Ova istraživanja pružaju vrijedne uvide u mikrobne interakcije u usnoj šupljini, što može biti ključno za razvoj novih terapijskih strategija za očuvanje oralnog zdravlja.

4.1. Antimikrobna aktivnost dobivenih izolata bakterija roda *Bacillus*

Kako bi se odredio potencijal dobivenih izolata i ispitala mogućnost primjene istih u inhibiciji patogenih bakterija, određena je antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline i supernatanta uzgojnog medija na bakterije *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™ i *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ te kvasac *Candida albicans* ATCC®10231™. Rezultati antimikrobne aktivnosti prikazani su na slici 6.



Slika 6. Sposobnost izoliranih sojeva bakterija roda *Bacillus* (U1- *Lacticaseibacillus paracasei*, U2- *Limosilactobacillus reuteri*, U3- *Lacticaseibacillus rhamnosus*) te metabolita proizvedeni od samih stanica (S- supernatant A14, M1, M2) u inhibiciji bakterija *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.*, i kvasca *Candida albicans* tijekom 24 sata uzgoja.

Testirani sojevi BMK pokazali su različite stupnjeve inhibicije patogenih mikroorganizama. Iz rezultata (slika 6) vidljivo je da je u slučaju *E coli*, najveća inhibicija, preko 70 % postignuta uz pomoć uzorka S točnije metabolita samih stanica (supernatant A14, M1, M2), zatim pomoću bakterije *Limosilactobacillus reuteri* preko 55 %, bakterijom *Lacticaseibacillu paracasei* preko 45 %, a najmanja inhibicija *E. coli* postignuta je bakterijom *Lacticaseibacillus rhamnosus*, manje od 25 %. Nadalje, u inhibiciji *S.aureus*, možemo očitati da su svi uzorci inhibirali uspješno navedenu bakteriju preko 60 % dok suprotno tome u inhibiciji *Sallmonella* manje od 40%. U slučaju *L. monocytogenes* inhibirana je uzorcima 1,2 i S preko 45 % a uzorkom 3 manje od 30 %. Dodatno u inhibiciji kvasca *Candida albicans* najbolje su se pokazali uzorci 2 i 3 preko 70 %.

Prethodne studije su pokazale da *L. rhamnosus* može inhibirati rast nekoliko patogena, kao što su *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* i *Listeria monocytogene*, a njegove antibakterijske aktivnosti su se razlikovale među različitim sojevima *L. rhamnosus* (Ozogul i Hamed, 2018). *L. rhamnosus* se generalno smatra korisnim za ljudsko zdravlje i često se koristi kao probiotik (Zamberlin i sur., 2012). Prema istraživanju koje su proveli Peng i sur. (2022) *Lactobacillus rhamnosus* je mogao inhibirati rast i izazvati smrt stanica *E. coli* i *S. aureus*, a njegova antibakterijska aktivnost uglavnom se pripisuje supernatantu kulture koji inducira oksidativni stres i uzrokuje oštećenje i propusnost stanične stijenke i membrane što rezultira oslobađanjem staničnog sadržaja. Također u istraživanju koje su proveli Kiousi i sur. (2023) došli su do zaključka da u inhibiciji *S.aureus* najveću učinkovitost ima *Lacticaseibacillus paracasei* što možemo vidjeti u rezultatima na slici 6.

4.2. Kvantifikacija sposobnosti formiranja biofilmova

Rezultati in vitro sposobnosti formacije biofilmova odabranih dentalnih patogena prikazani su u tablici 2. Svi testirani sojevi bakterija roda *Streptococcus* su klasificirani kao umjereni producenti biofilma prema skali od Borges i sur., (2012) te je kvasac *Candida albicans* također klasificiran kao umjereni producent biofilma. Sve bakterije mliječne kiseline osim *Lacticaseibacillus paracasei* (jaka formacija biofilma) su također klasificirane kao umjereni producenti biofilma.

Tablica 2. Sposobnost formacije biofilma odabranih dentalnih patogena te bakterija mliječne kiseline. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost trostrukog mjerenja OD₆₂₀ ± standardna devijacija te klasifikacija u skupinu jačine sposobnosti formiranja biofilma (jaki producenti, umjereni producenti, slabi producenti te u nemogućnosti formirati biofilm).

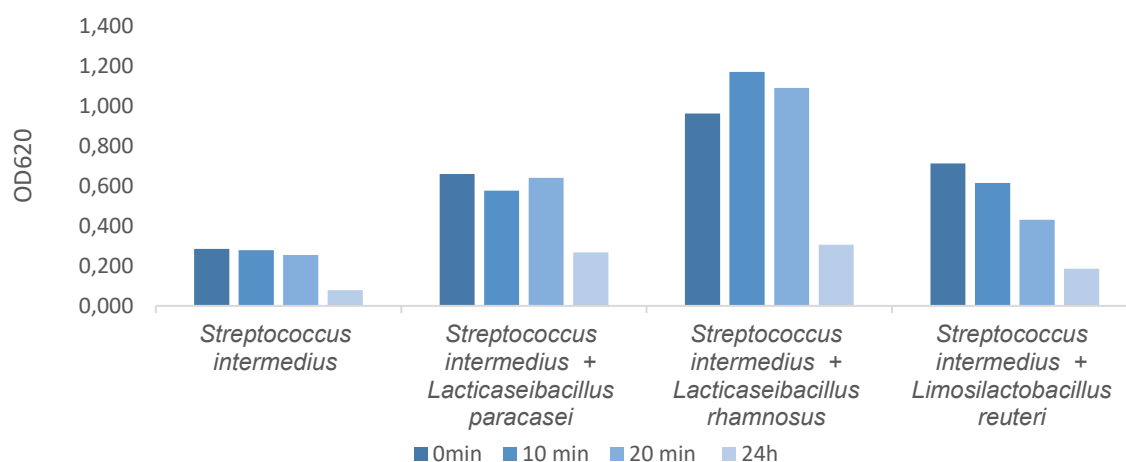
	OD ₆₂₀	Klasifikacija
<i>Streptococcus intermedius</i>	0,214 ± 0,115	Umjerena formacija biofilma
<i>Streptococcus mutans</i>	0,279 ± 0,138	Umjerena formacija biofilma
<i>Candida Albicans</i>	0,180 ± 0,009	Umjerena formacija biofilma
<i>Lactiseibacillus rhamnosus</i>	0,099 ± 0,012	Umjerena formacija biofilma
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	0,146 ± 0,007	Umjerena formacija biofilma
<i>Lactiseibacillus paracasei</i>	0,642 ± 0,452	Jaka formacija biofilma
<i>Lactiseibacillus rhamnosus</i> + <i>Limosilactobacillus reuteri</i> + <i>Lactiseibacillus paracasei</i>	0,143 ± 0,041	Umjerena formacija biofilma

Dobiveni rezultati ukazuju na umjerenu 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). Rajoka i sur. (2017) su prikazali slične rezultate za sojeve bakterija mliječne kiseline (BMK) s izraženim probiotičkim potencijalom, izolirane iz humanog mlijeka. Sposobnost stvaranja snažnih biofilmova ključna je za prilagodbu na stresne uvjete okoliša i kolonizaciju različitih niša. Primjerice, kod roda *Lactobacillus*, ova sposobnost se smatra izuzetno korisnom jer omogućava dulju prisutnost na sluznicama te sprječava kolonizaciju patogenih bakterija (Terraf i sur., 2012).

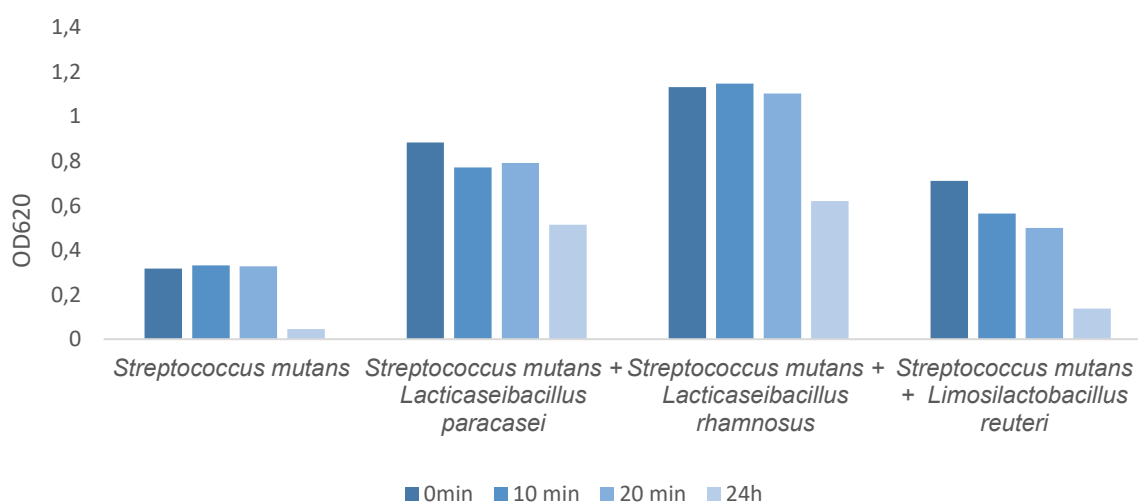
4.3. Koagregacija dentalnih patogena roda *Streptococcus* s probiotičkim bakterijama mliječne kiseline

Koagregacija je proces u kojem različite vrste bakterija ili drugih mikroorganizama međusobno povezuju i formiraju agregate ili grudvice. Ovaj proces može biti važan u mnogim biološkim kontekstima, uključujući oralnu i gastrointestinalnu mikrofloru, gdje se bakterije mogu koagregirati kako bi stvorile kompleksne zajednice. Određena je koagregacija bakterija roda *Streptococcus* sa bakterijama mliječne kiseline. Na slikama 7 i 8 prikazan je stupanj koagregacije dentalnih patogena *Streptococcus intermedius* i *Streptococcus mutans* s bakterijama mliječne kiseline *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lactocaseibacillus paracasei*.



Slika 7. Stupanj koagregacije bakterije *Streptococcus intermedius* bakterijama mliječne kiseline *Lactocaseibacillus rhamnosus* DSM 20021, *Limosilactobacillus reuteri* DSM 20016 i *Lactocaseibacillus paracasei* DSM 4905

Iz dobivenih rezultata (slika 7) možemo zaključiti da su zabilježena značajna statistička odstupanja sva tri uzorka od kontrole. Najveća koagregacija se očitava u mjeranju *Streptococcus intermedius* sa *Lactocaseibacillus rhamnosus* gdje najveću koagregaciju očitavamo nakon 10 minuta eksperimenta.

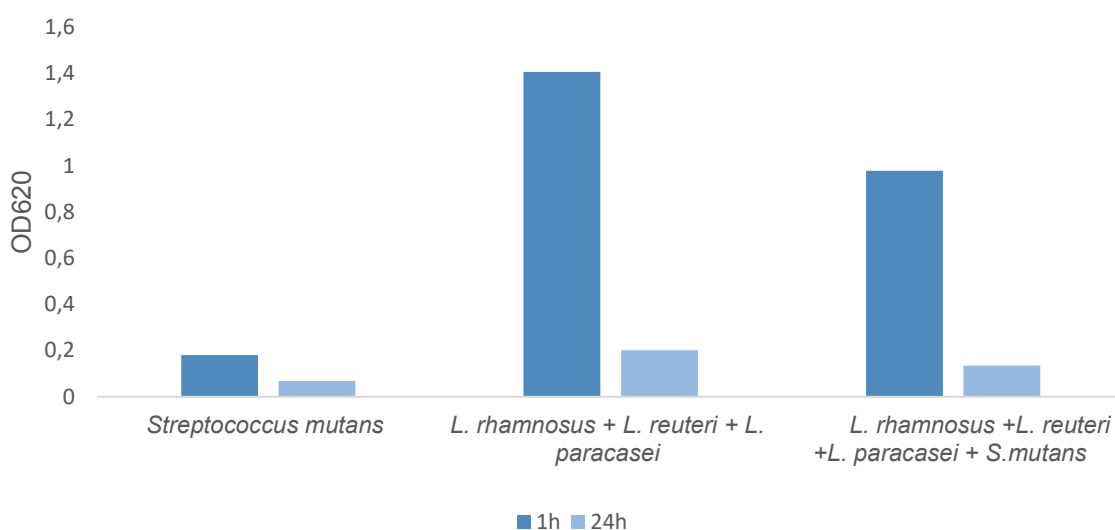


Slika 8. Stupanj koagregacije bakterije *Streptococcus mutans* s bakterijama mliječne kiseline *Lactocaseibacillus rhamnosus* DSM 20021, *Limosilactobacillus reuteri* DSM 20016 i *Lactocaseibacillus paracasei* DSM 4905

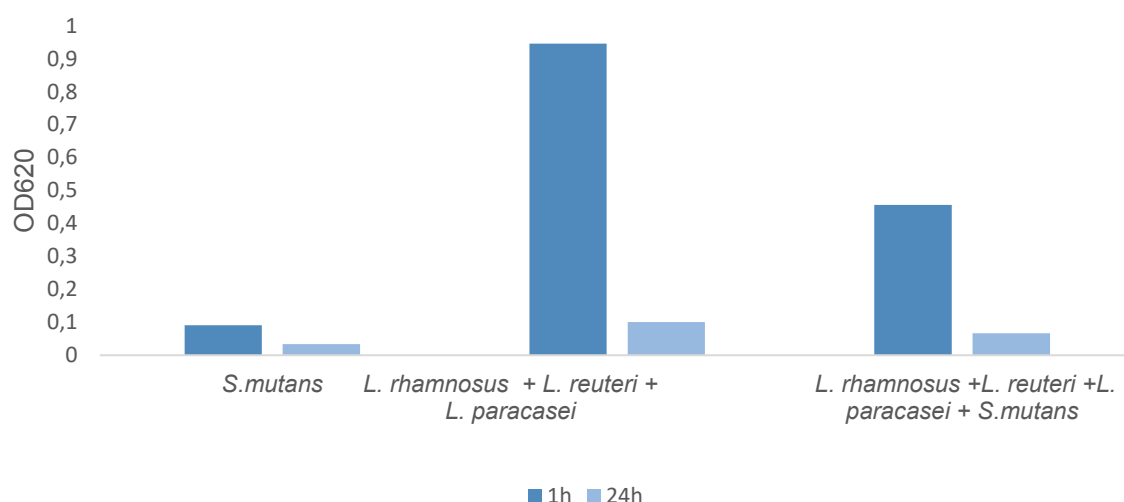
Na slici 8 možemo očitati rezultate koagregacije *Streptococcus mutans* sa BMK gdje su također zabilježena značajna odstupanja uzoraka od kontrole. Koagregacija *Streptococcus mutans* s *Lactocaseibacillus rhamnosus* je vrlo visoka tijekom prvih 20 minuta eksperimenta, a nakon 24 h bilježimo pad. Kod ostala dva soja vidimo također pad koagregacije nakon 24h. Sukladno tome, u istraživanju koje su proveli Lang i sur. (2010) dobili su iste rezultate sposobnosti koagregacije patogena *S. mutans* sa *Lactobacillus paracasei* i *Lactobacillus rhamnosus*. Ovi rezultati sugeriraju da određene podvrste *L. paracasei* i *L. rhamnosus* imaju potencijalnu sposobnost da se suprotstave *S. mutans* putem koagregacije, što može imati implikacije za razvoj probiotičkih strategija za oralno zdravlje.

4.4. Autoagregacija dentalnih patogena te kvasca *C.albicans* u prisutnosti *Lactobacillus* vrsta

Autoagregacija je ključan proces u mikrobiologiji koji se odnosi na sposobnost mikroorganizama da se međusobno povezuju i formiraju veće nakupine ili agregate. Ovaj proces je od velikog značaja jer može utjecati na različite biološke funkcije i interakcije, uključujući kolonizaciju, formiranje biofilma, te otpornost na antimikrobne agense. U ovom radu fokusiramo se na istraživanje autoagregacije dentalnih patogena *Streptococcus mutans* i *Streptococcus intermedius* te kvasca *Candida albicans* u prisutnosti navedenih *Lactobacillus* vrsta te kako ove interakcije, kao i različite koncentracije uzoraka, mogu utjecati na njihov rast i ponašanje. Povećana optička gustoća tijekom eksperimenta koristit će se kao indikacija formiranja agregata, pružajući nam uvid u dinamiku autoagregacije. Rezultati su prikazani na slikama 9-14.

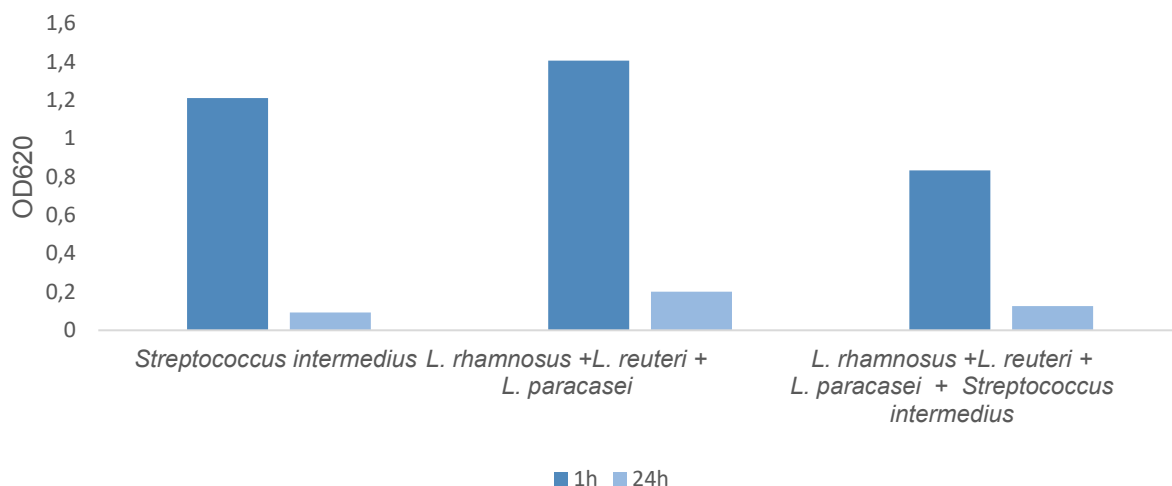


Slika 9. Prikaz autoagregacije nerazrijeđenih uzoraka *Streptococcus mutans* i bakterija mliječne kiseline *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lacticaseibacillus paracasei*.

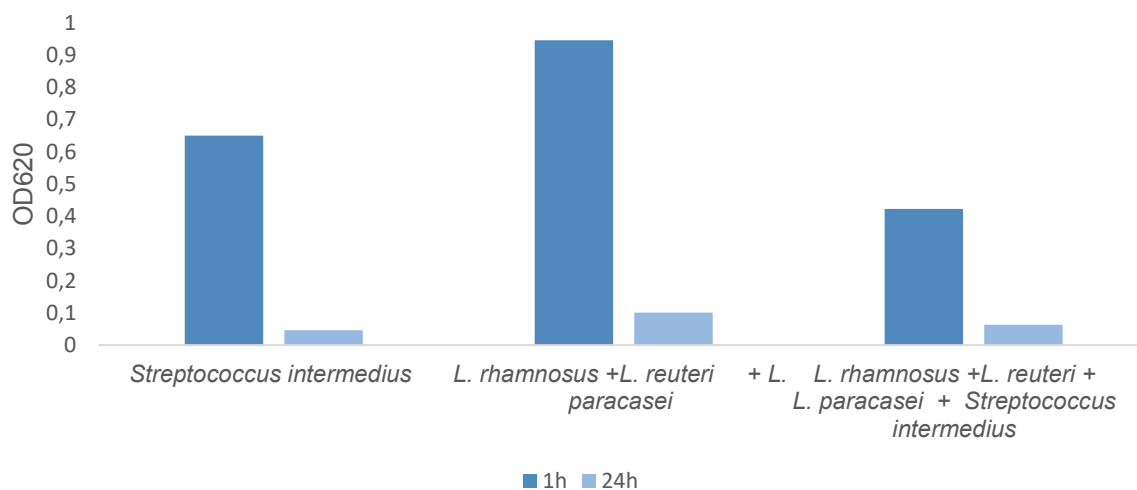


Slika 10. Prikaz autoagregacije razrijeđenih uzoraka *Streptococcus mutans* i bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lactobacillus paracasei*

Iz rezultata na slikama 9 i 10, možemo zaključiti da visoka optička vrijednost autoagregacije *Streptococcus mutans* i bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lactobacillus paracasei* sugerira da je došlo do značajne autoagregacije u početku gdje visoka optička gustoća ukazuje na prisutnost velikih agregata koji raspršuju svjetlost, što je pokazatelj da su se bakterije uspješno povezale i formirale veće nakupine. Pad vrijednosti može značiti da su se početno formirani agregati razgradili ili destabilizirali tijekom vremena, te bez obzira na početnu koncentraciju uzoraka, efekt autoagregacije i pad optičke gustoće ostaju konzistentni, što dodatno potvrđuje učinkovitost navedenih bakterija mliječne kiseline u inhibiciji patogenih bakterija i održavanju oralnog zdravlja. Sukladno tome u istraživanju koje su proveli Ciandrini i sur. (2017) *Lactobacillus paracasei* i *Lactobacillus rhamnosus* inhibirali su autoagregacijom *S. mutans*.

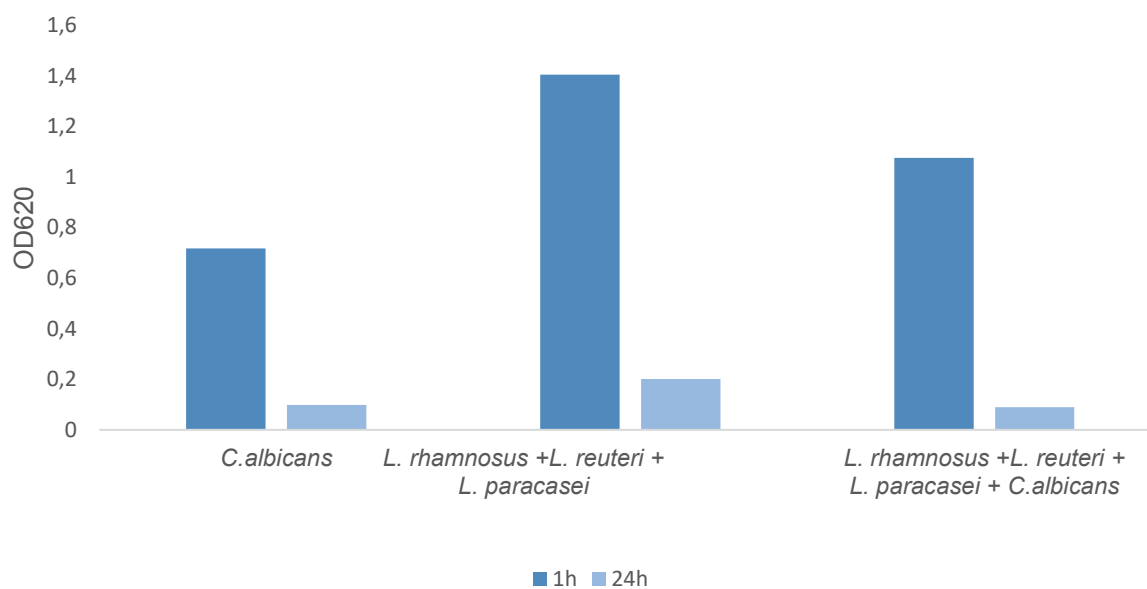


Slika 11. Prikaz autoagregacije nerazrijeđenih uzoraka *Streptococcus intermedius* i bakterija mliječne kiseline *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lacticaseibacillus paracasei*

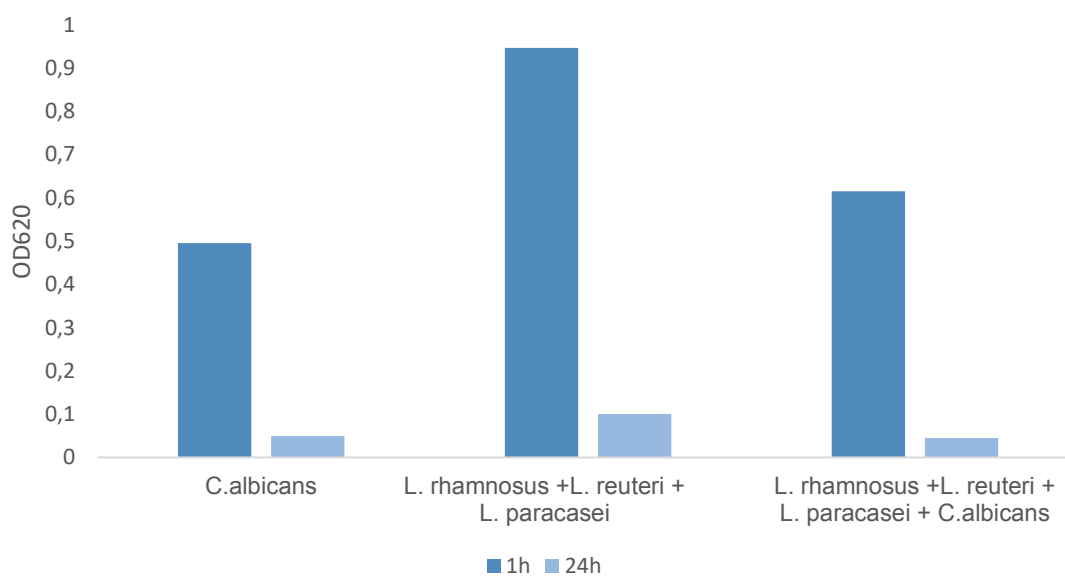


Slika 12. Prikaz autoagregacije razrijeđenih uzoraka *Streptococcus intermedius* i bakterija mliječne kiseline *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lacticaseibacillus paracasei*.

Također, na slikama 11 i 12 možemo primjetiti da bez obzira na razrijeđenje sposobnost autoagregacije ostaje ista.



Slika 13. Prikaz autoagregacije nerazrijeđenih uzoraka *C. albicans* i bakterija mliječne kiseline *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lactocaseibacillus paracasei*.



Slika 14. Prikaz autoagregacije razrijeđenih uzoraka *C. albicans* i bakterija mliječne kiseline *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lactocaseibacillus paracasei*.

Na slikama 13 i 14 vidimo kao i u prethodnim grafovima da se sposobnost inhibicije zadanih patogenih bakterija mliječne kiseline povećava nakon 24h, točnije agregati se razgrađuju. Prema istraživanju Ström i sur. (2002) primijetili su da su nekoliko antifungalnih spojeva, poput cikličkih dipeptida, pirolglutaminske kiseline i laktona, proizvedeni od izolata *Lactobacillus* vrsta i imaju važnu ulogu protiv vrsta *Candida*. Stoga su daljnja istraživanja potrebna kako bi se razjasnila priroda inhibicijske tvari proizvedene od strane izolata BMK protiv kvasca.

5. ZAKLJUČAK

1. Određena je antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline i supernatanta uzgojnog medija na bakterije *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* i *Listeria monocytogenes* te kvasac *Candida albicans*. Najbolji rezultati postignuti su u inhibiciji bakterije *Staphylococcus aureus* korištenjem svih uzoraka, s postignutom inhibicijom od preko 60 %.
2. U ovom radu određena je in vitro sposobnost formacije biofilma za odabrane dentooralne patogene: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius*, te *Candida albicans* i za bakterije mliječne kiseline *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lacticaseibacillus paracasei*. Testirani sojevi bakterija roda *Streptococcus* te kvasac *Candida albicans* klasificirani su kao umjereni proizvođači biofilma prema skali Borges i sur., 2012. Testirani sojevi bakterija mliječne kiseline, isključujući *Lacticaseibacillus paracasei* (koji pokazuje snažnu formaciju biofilma), klasificirani su kao umjereni proizvođači biofilma.
3. Određena je koagregacija bakterija roda *Streptococcus* (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius*) sa bakterijama mliječne kiseline *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lacticaseibacillus paracasei*. Najveća koagregacija se očita u mjerenju *Streptococcus intermedius* i *Streptococcus mutans* sa *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

6. POPIS LITERATURE

Bartnicka D, Gonzalez-Gonzalez M, Sykut J, Koziel J, Ciaston I, Adamowicz K i sur. (2021) Candida albicans shields the periodontal killer Porphyromonas gingivalis from recognition by the host immune system and supports the bacterial infection of gingival tissue. *Int J Mol Sci* **6**, 1984. <https://doi.org/10.3390/ijms21061984>

Belibasakis GN (2018) Microbiological changes of the ageing oral cavity. *Arch Oral Biol* **96**, 230–232. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.08.016>

Blankenship JR, Mitchell AP (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective. *COMICR* **9**, 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003>

Chung MH, Kaste LM, Koerber A, Fadavi S, Puwani I (2006) Dental and medical students' knowledge and opinions of infant oral health. *JDE* **5**, 511–517. <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2006.70.5.tb04007.x>

Ciandrini E, Campana R, Baffone W (2017) Live and heat-killed Lactobacillus spp. interfere with Streptococcus mutans and Streptococcus oralis during biofilm development on titanium surface, *Arch Oral Biol* **78**, 48-57, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.02.004>

Deo PN, Deshmukh R (2019) Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *JOMFP* **23**, 122-128. https://doi.org/10.4103%2Fjomfp.JOMFP_304_18

Epstein JB (1990) Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **69**, 32–41. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(90\)90385-B](https://doi.org/10.1016/0030-4220(90)90385-B)

Fanning S, Mitchell AP (2012) Fungal biofilms. *PLoS Pathogens* **8**, e1002585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>

Finkel JS, Mitchell AP (2011) Genetic control of Candida albicans biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **9**, 109–118. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2475>

Greenwood D, Afacan B, Emingil G, Bostanci N, Belibasakis GN (2020) Salivary microbiome shifts in response to periodontal treatment outcome. *Clin. Proteom.* **14**, e2000011. <https://doi.org/10.1002/prca.202000011>

Halib N, Rahman NZA, Hanafiah RM, Roslan N, Jauhar N (2019) A simplified system for simulation of Streptococcus mutans biofilm on healthy extracted human tooth as dental plaque model. *JAPS* **9**, 112-115. <https://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2019.90215>

Jäsberg H (2017). Probiotic bifidobacteria and lactobacilli in oral health-interactions with biofilms and the host. *Turun yliopisto* **2**, 20-23. <https://urn.fi/URN:ISBN:978-951-29-6837-4>

Jones D, Brown E, Davis F (2019) Balancing the oral microbiome with probiotics. *Clin. Oral Investig.* **23**, 45-50. <https://doi.org/10.1016%2Fj.heliyon.2023.e13475>

Jorgensen MR, Kragelund C, Jansen P, Keller MK, Twetman S (2017) Probiotic Lactobacillus reuteri has antifungal effects on oral Candida species In Vitro. *Arch Oral Biol* **9**, 127–135. <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1274582>

Jurić H, Klarić T, Lulić-Dukić O (2003) Caries Incidence in Children with Regard to their Oral Hygiene Habits and Past Caries Experience. *ASCRO* **3**, 340–341. <https://hrcak.srce.hr/3287>

Kiousi DE, Efstathiou C, Tzampazlis V, Plessas S, Panopoulou M, Koffa M, Galanis A (2023) Genetic and phenotypic assessment of the antimicrobial activity of three potential probiotic lactobacilli against human enteropathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, 13:1127256. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1127256>

Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J (2003) Formation of Candida albicans biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci* **6**, 465–471. <https://doi.org/10.1111/j.0909-8836.2003.00084.x>

Lang C, Böttner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Ryser M i sur. (2010) Specific Lactobacillus/Mutans Streptococcus Co-aggregation. *J Dent Res* **2**, 175-179. <https://doi.org/10.1177/0022034509356246>

Lee H, Kim M, Park S (2021). Postbiotics in oral health: Benefits and mechanisms. *Probiotics Antimicrob. Proteins.*, **4**, 678-687. <https://doi.org/10.3389%2Ffcimb.2023.1120995>

Loesche WJ (1984) Periodontal disease as a risk factor for heart disease. *Compendium* **8**, 976. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7741856/>

Loesche WJ (1986) Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, **353**. <https://doi.org/10.1128/mr.50.4.353-380.1986>

Mahasneh SA, Mahasneh AM (2017) Probiotics: A Promising Role in Dental Health. *Dent J* **5**, 26. <https://doi.org/10.3390%2Fdj5040026>

Matsumoto-Nakano M (2018) Role of Streptococcus mutans surface proteins for biofilm formation. *JDSR* **1**, 22-29. <https://doi.org/10.1016%2Fj.jdsr.2017.08.002>

Monds RD, O'Toole GA (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* **2**, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>

O'Donnell LE, Millhouse E, Sherry L, Kean R, Malcolm J, Nile CJ, Ramage G (2015) Polymicrobial Candida biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res* **7**. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov077>

Ozogul F, Hamed I (2018) The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Crit Rev Food Sci* **10**, 1660–1670. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1277972>

Peng H, Zhou G, Yang M, Chen GJ, Chen HB, Liao ZL i sur. (2022) Transcriptomic Analysis Revealed Antimicrobial Mechanisms of *Lactobacillus rhamnosus* SCB0119 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci* **23**, 15159. <https://doi.org/10.3390/ijms232315159>

Poliklinika Smile (2018) <https://smile.hr/karijes-na-zubu-i-posljedice-ako-se-ne-lijeci/>
Pristupljeno 25. svibnja 2024.

Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EM i sur. (2021) The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007) Dental caries. *Lancet* **369**, 51-9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)60031-2)

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranyake LP (2008) Biofilm lifestyle of Candida: a mini review. *Oral Dis* **14**, 582–90. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x>

Smith A, Johnson B, Thompson C (2020) Probiotic effects on oral health: A review. *J Oral Microbiol* **1**, 123-130. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2897872/>

Smith AV, Bowen WH (2000) In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol.* **4**, 277-291. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(99\)00141-7](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(99)00141-7)

Stamatova I, Meurmann JH (2009) Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent* **6**, 329-31. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20178208/>

Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J (2002) *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4322-4327. <https://doi.org/10.1128/aem.68.9.4322-4327.2002>

Šušković J, Kos B, Matošić S (1998) Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend? *Mlje-karstvo* **48**, 165–176. <https://hrcak.srce.hr/94838> Pristupljeno 20. svibnja 2024.

Thuy D, Devine D, Marsh P, (2013) Oral biofilms: Molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosm Investig Dent* **5**, 11–19. <https://doi.org/10.2147/ccide.s31005>

Zamberlin S, Spehar ID, Kelava N, Samarzija D (2012) Probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus*: Beneficial and a dverse effects on human health. *Milchwissenschaft-Milk Sci Int* **67**, 30–33. <https://www.bib.irb.hr:8443/508683>

Zhong Z, Zhou Z, Liang Y, Zheng P (2022) Optimizing postbiotic production through solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* J and *Lactiplantibacillus plantarum* SN4 enhances antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Front. microbiol.* **12**, 741320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1229952>

Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P (2018) *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Micorbiol.* **8**, 915-93. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0043>

Zubarolog (2020) <https://zubarolog.rs/karijes-uzroci-simptomi-vrste-dijagnoza-komplikacije-lecenje/> Pristupljeno 25. svibnja 2024.

Izjava o izvornosti

Ja Ana Šiljeg izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis