

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NASTJA NOVAK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NASTJA NOVAK

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA BAKTERIJ Z
ANTIMIKROBNIM UČINKOM PROTI BAKTERIJI
*AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS***

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA WITH
ANTIMICROBIAL EFFECT AGAINST BACTERIA
*AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS***

Ljubljana, 2017

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravila na Inštitutu za metagenomiko in mikrobne tehnologije, Stegne 7, 1000 Ljubljana. Vzorčenje prostovoljcev je potekalo na Stomatološki kliniki, Hrvatski trg 6, 1000 Ljubljana.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici, prof. dr. Petri Kocbek za ves trud, podporo in strokovni pregled naloge. Posebna zahvala gre somentorju znan. svet. dr. Alešu Lapanje za vso podporo, podajanje znanja, napotke tekom dela, strokovno pomoč pri nastajanju in pisanju naloge. Hvala vsem iz Inštituta za metagenomiko in mikrobne tehnologije za vso pomoč, svetovanje tekom dela in podporo. Zahvaljujem se dr. Milan Petelinu, Anji Rauter in vsem ostalim iz Stomatološke klinike za pomoč pri organizaciji vzorčenja ustne votline. Zahvaljujem se predsednici komisije prof. Lundrovi in članu komisije prof. Mravljaku za strokovni pregled naloge. Zahvaljujem se tudi prodekanu prof. dr. Alešu Obrezi za nadomeščanje prof. Lundrove na zagovoru magistrske naloge.

Hvala staršem za spodbudo in finančno podporo tekom študija. Hvala Beniju za vso podporo, pomoč in motivacijo. Prav tako gre zahvala Martini in ostalim prijateljem za zabavne trenutke, ki smo jih preživeli skupaj.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Petre Kocbek in somentorstvom znan. svet. dr. Aleša Lapanje.

Ljubljana, 2017

Nastja Novak

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Mojca Lunder

Član magistrske komisije: izr. prof. dr. Janez Mravljak

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1. NORMALNA MIKROBNA FLORA USTNE VOTLINE	1
1.1.1. Razvoj in razporeditev mikrobiote v ustni votlini.....	1
1.1.2. Dejavniki, ki vplivajo na rast mikroorganizmov v ustni votlini	2
1.1.3. Vloga oralnega mikrobioma pri ohranjanju zdravja	3
1.1.4. Mikrobiota ustnic	4
1.1.5. Mikrobiota sluznice lic.....	5
1.1.6. Mikrobiota jezika	5
1.1.7. Mikrobiota sline	5
1.1.8. Mikrobiota zob	6
1.2. POMEN IN NASTANEK ZOBNEGA BOFILMA.....	7
1.3. PARODONTALNA BOLEZEN	9
1.3.1. Parodontalno patogene bakterije	10
1.3.1.1. Bakterija <i>Porphyromonas gingivalis</i>	12
1.3.1.2. Bakterija <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	13
1.4. ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI.....	13
1.4.1. Tradicionalno zdravljenje.....	13
1.4.2. Zdravljenje s probiotiki	13
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.4. Materiali.....	16
3.4.1. Laboratorijska oprema.....	16
3.4.2. Kemikalije in reagenti	17
3.4.3. Biološki material	19
3.4.4. Pufer, raztopine in gojišča	19
3.4.4.1. Raztopine in pufer	19
3.4.4.2. Gojišča.....	21
3.5. METODE.....	25
3.5.1. Načrt eksperimentalnega dela	25
3.5.2. Vzorčenje ustne votline.....	27

3.5.3. Gojenje in izolacija bakterij iz ustne votline	28
3.5.4. Gojenje izbranih parodontalno patogenih sevov	29
3.5.5. Testiranje protimikrobnega učinka izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo <i>Escherichia coli</i>	29
3.5.6. Testiranje protimikrobnega učinka izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	30
3.5.7. Izolacija DNA izoliranih bakterijskih sevov iz čistih kultur	31
3.5.8. PCR analiza izolirane DNA	32
3.5.9. Agarozna gelska elektroforeza pomnožene DNA	33
3.5.10. Analiza rezultatov sekvenciranja	33
3.5.11. Statistične metode	34
4. REZULTATI	35
4.4. Izolirani bakterijski sevi iz ustne votline	35
4.5. Testiranje protimikrobnega učinka izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo <i>Escherichia coli</i>	35
4.6. Testiranje protimikrobnega učinka izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	39
4.7. Analiza rezultatov sekvenciranja	45
5. DISKUSIJA	49
6. SKLEPI	56
7. LITERATURA	57
8. PRILOGE	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz nastanka biofilma (30).....	9
Slika 2: Shema eksperimentalnega dela	26
Slika 3: Vzorčenje ustne votline na različnih mestih: (A) vzorčenje bukalne skuznice, (B) jezika in (C) površine zob s sterilno kireto ter (D) vzorčenje sline.....	28
Slika 4: Shema izvedbe testa protimikrobnega delovanja izoliranih bakterijskih sevov iz ustne votline na <i>E. coli</i>	30
Slika 5: Primer izvedbe testa protimikrobne učinkovitosti na <i>A. actinomycetemcomitans</i> (v okolici testiranega bakterijskega seva iz ustne votline je jasno vidna cona lize).....	31
Slika 6: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>E. coli</i> glede na celokupno število testiranih sevov.....	35
Slika 7: Vpliv časa vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>E. coli</i>	36
Slika 8: Vpliv mesta vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>E. coli</i>	36
Slika 9: Povprečni premeri cone lize (cm) sevov izoliranih iz gojišča Emerson in gojišča z ovsenimi kosmiči na <i>E. coli</i> in prikaz SD-jev (dve ponovitvi).	38
Slika 10: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>E. coli</i> glede na čas vzorčenja.	38
Slika 11: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>E. coli</i> glede na mesto vzorčenja.....	39
Slika 12: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i> glede na seve s protimikrobnim učinkom na <i>E. coli</i>	40
Slika 13: Vpliv časa vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i>	40
Slika 14: Vpliv časa vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i>	41
Slika 15: Vpliv mesta vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i>	41
Slika 16: Vpliv mesta vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i> izoliranih iz gojišča Emerson in gojišča z ovsenimi kosmiči.	42
Slika 17: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i> glede na čas vzorčenja.....	42
Slika 18: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i> glede na mesto vzorčenja.	43
Slika 19: Premeri cone lize sevov izoliranih iz gojišča Emerson in iz gojišča z ovsenimi kosmiči na <i>A. actinomycetemcomitans</i> po 72 h.....	44
Slika 20: Filogenetska drevesa izoliranih bakterijskih sevov izrisana v programu MEGA.....	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Razvrstitev mikroorganizmov v bakterijske komplekse	12
Preglednica II: Potek PCR programa.	33
Preglednica III: Premeri cone lize (cm) sevov s protimikrobnim učinkom na <i>E. coli</i> izoliranih iz različnih gojišč.....	37
Preglednica IV: Premeri cone lize (cm) sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i> izoliranih iz različnih gojišč.	43
Preglednica V: Protokol izbora prostovoljcev in vzorčenja za izolacijo sevov s protimikrobnim učinkom na <i>A. actinomycetemcomitans</i>	55
Preglednica VI: Izolirani bakterijski sevi	61

POVZETEK

Ustna votlina predstavlja habitat številnim vrstam mikroorganizmov, ki v določenih pogojih lahko povzročijo različne bolezni, kot je parodontalna bolezen. Ker trenutne smernice zdravljenja ne vodijo do želenih rezultatov, so aktualni novi pristopi zdravljenja, med katere spada tudi lokalno zdravljenje s probiotiki. To zdravljenje temelji na inhibiciji rasti parodontalno patogenih bakterij in zaradi razrasti probiotičnih bakterij ter nastanka probiotičnega biofilma onemogoči ponovno kolonizacijo patogenih mikrobov. Namen magistrske naloge je bil pridobiti avtohtone bakterijske seve s protimikrobnim učinkom proti parodontalno patogeni bakteriji *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* iz ustne votline posameznikov z majhnim številom zalivk na zobeh. Za pridobitev bakterijskih sevov s protimikrobnim učinkom smo razvili protokol vzorčenja ustne votline. Ovrednotili smo vpliv vnosa hrane na pojavnost sevov s protimikrobnim učinkom, zato smo vzorčenje izvedli v različnih časovnih točkah (jutranje, popoldansko vzorčenje in t.i. vzorčenje z minimalnim vplivom hrane). Preverili smo tudi ali so sevi s protimikrobnim učinkom prisotni v vseh ekoloških biotopih, zato smo vzorčili štiri različna mesta v ustni votlini (slino, bukalno sluznico, jezik in površino zob). Uporabili smo obogatitvena gojišča za izolacijo aktinomicet in po Gramu pozitivnih bakterij. V naslednjem koraku smo razvili metodo za vrednotenje protimikrobnega učinka izoliranih bakterij na bakteriji *Escherichia coli* in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ugotovili smo, da izolirani bakterijski sevi iz ustne votline kažejo protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans* iz vseh mest ustne votline in iz vseh časovnih točk. S tem smo pokazali, da prispeva k zdravi ustni flori tako hipoteza o ekološki niši kot hipoteza emigracije in imigracije. V zaključni fazi raziskave smo izolirane bakterije s protimikrobnim učinkom karakterizirali z molekularnimi mikrobiološkimi metodami. Večina sevov s protimikrobnim učinkom izoliranih iz ustne votline, ki delujejo proti *A. actinomycetemcomitans* spada v rod *Bacillus*. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko predlagamo bakterije rodu *Bacillus* kot probiotični način zdravljenja parodontalne bolezni. Naša študija je prvi primer, kjer smo iz ustne votline izolirali bakterije rodu *Bacillus* s protimikrobnim učinkom na parodontalno patogeno bakterijo *A. actinomycetemcomitans*.

KLJUČNE BESEDE

Ustna votlina, gojitvene metode, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, protimikrobne snovi, *Bacillus*

ABSTRACT

The oral cavity represents a habitat for many species of microorganisms, which in certain conditions can cause various diseases, such as periodontal disease. Since current treatment guidelines do not lead to desired results, new approaches are under development, which also includes local treatment with probiotics. This approach is based on the inhibition of the growth of periodontal pathogenic bacteria, and due to the growth of probiotic bacteria and the formation of a probiotic biofilm prevents re-colonization of pathogenic microbes. The purpose of the master's thesis was to obtain autohtonous bacterial strains with antimicrobial effect against periodontal pathogenic bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* from the oral cavity of individuals with small number of dental fillings. In order to obtain bacterial strains with antimicrobial effect, we have developed a protocol of sampling the oral cavity. We evaluated the effect of food intake on the appearance of strains with antimicrobial effects, so we performed the sampling at different time points (morning, afternoon, and a so-called sampling with minimal impact of food). We also checked whether the strains with antimicrobial activity are present in all ecological biotopes, therefore samples were taken from four different positions in the mouth (saliva, buccal mucosa, tongue and the surface of the tooth). We used the enrichment medium for the isolation of actinomycetes and Gram-positive bacteria. In the next step, we have developed a method for the evaluation of the antimicrobial effect of the isolated bacteria on the bacteria *Escherichia coli* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. We have found that isolated bacterial strains from the oral cavity show an antimicrobial effect on *A. actinomycetemcomitans* from all sites of the oral cavity and from all time points. Thus, we have shown that the hypothesis of ecological niche, and the hypothesis of emigration and immigration contribute to a healthy oral flora. In the final phase of the research, we characterized isolated bacteria with antimicrobial effect by molecular microbiological methods. Most strains isolated from the oral cavity with antimicrobial effect against *A. actinomycetemcomitans* belong to the genus *Bacillus*. Based on the obtained results we may suggest the genus *Bacillus* as a probiotic method for treatment of periodontal disease. Our study is the first case in which we have isolated bacteria from the oral cavity belonging to the genus *Bacillus*, with antimicrobial effect on periodontal pathogenic bacteria *A. actinomycetemcomitans*.

KEYWORDS

Oral cavity, cultivation techniques, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, antimicrobial substances, *Bacillus*

SEZNAM OKRAJŠAV

A.a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

BHI: Možgansko–srčni infuzijski bujon (Brain heart infusion medium)

CFU: Kolonijska enota (Colony forming unit)

dH₂O: Destilirana voda

DNA: Deoksiribonukleinska kislina

dNTP: Deoksiribonukleotid trifosfat

EDTA: Etilendiamintetraocetna kislina

NB: Hranilni bujon (Nutrient broth medium)

PCR: Verižna reakcija s polimerazo

RNA: Ribonukleinska kislina

1. UVOD

1.1. NORMALNA MIKROBNA FLORA USTNE VOTLINE

1.1.1. Razvoj in razporeditev mikrobiote v ustni votlini

Ustna votlina človeka je bivališče različnih kompleksnih mikrobnih združb. Mikroorganizmi se naseljujejo postopoma skozi celo življenje posameznika. Skozi življenje pa se spreminja tudi število in vrsta mikroorganizmov v ustni votlini. Pred porodom je ustna votlina novorojenčka sterilna. Nekaj ur po porodu (4 – 12 ur) ustno votlino novorojenčka poselijo aerobne bakterije med katerimi so predvsem streptokoki in laktobacili. V prvem letu otrokovega življenja se v ustno votlino naselijo predvsem bakterije iz rodu *Streptococcus* (*Streptococcus salivarius*), v manjšem številu pa *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria* spp. in *Veillonella* spp. Po izrastu prvih mlečnih zob se na trdne površine (zobe) v ustih naselijo *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Rothia dentocariosa* in *Capnocytophaga* spp.. V zdravi ustni votlini otroka do pubertete najdemo bakterije vrst *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mutans*), *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leptotrichia buccalis*, *Porphyromonas* spp. in *Prevotella* spp.. Po izrastu stalnih zob se s poglobljanjem gingivalnih žepov pojavijo tudi anaerobne bakterije, katerih delež je v zdravi ustni votlini vedno manjši od 1 % celotne mikrobne flore. Gre za anaerobne koke, porfiromonade, prevotele, kampilobakte in treponeme. Treponeme v velikih količinah najdemo v subgingivalni mikroflori, medtem ko jih na zdravi sluznici opazimo redko in to v majhnem številu. Ustna votlina starostnika je podobna dojenčkovi, tako prevladujejo *S. salivarius*, *S. epidermidis*, *Neisseria* spp., *Corynebacterium* spp. in *Veillonella* spp. (1,2).

Ustna votlina je področje, na katerem je mikrobiota razporejena neenakomerno, saj obstajajo različni habitati, ki omogočajo rast različnih mikrobnih združb (3). Bakterije naselijo (kolonizirajo) tista področja v ustni votlini, kjer obstajajo ugodni pogoji za njihov razvoj in rast. V ustni votlini obstajajo štiri različni ekološki biotopi: ustna sluznica (bukalna sluznica), jezik, slina in zobje, ki predstavljajo edino trdno površino v ustni votlini (4). V nadaljevanju je predstavljena mikrobiota na različnih mestih v ustni votlini, ki je definirana kot skupnost komenzalnih, simbiotskih in patogenih mikroorganizmov v ustni votlini.

1.1.2. Dejavniki, ki vplivajo na rast mikroorganizmov v ustni votlini

Na sestavo oralne mikrobiote vplivajo pH in temperatura v ustni votlini, gostiteljevi obrambni mehanizmi in genetski dejavniki (npr. aktivnost imunskega sistema, pH itd.). Za rast večine mikroorganizmov v ustni votlini je potreben nevtralen pH mikrookolja (5). pH na različnih mestih v ustni votlini uravnava slina, katere pH variira med 6,0 in 7,5 (6). Na pH sline vpliva prehrana in tudi intrinzični dejavniki, kot sta hitrost pretoka in puferska kapaciteta sline. Komponente sline, ki imajo veliko puferno kapaciteto so hidrojenkarbonatni in fosfatni ioni ter proteini (7). Po zaužitju alkalne hrane pH biofilma pade na 5,0 zaradi tvorbe kombinacije lahkohlapnih maščobnih kislin (ocetna kislina, mlečna kislina itd.), ki nastanejo kot stranski produkt metabolizma ogljikovih hidratov. S časom se pH biofilma vrne v ustaljeno območje. Večina bakterij lahko tolerira takšne spremembe pH-ja, a kadar so izpostavljene takšnemu okolju dlje časa, je to za njih lahko usodno. pH v zdravih obzobnih žepih je okoli 6,9 in se pri parodontalni bolezni zviša na 7,2–7,4. Takšna sprememba pH-ja v obzobnih žepih omogoči rast patogenih anaerobnih vrst, kot je *Porphyromonas gingivalis*, ki optimalno raste pri pH okoli 7,5 (1).

V ustni votlini je relativno konstantna temperatura, ki se giblje med 35 – 36 °C, in zagotavlja stabilne razmere, primerne za rast širokega spektra mikroorganizmov. V parodontalnih žepih, kjer poteka vnetje, je temperatura višja, in sicer 39 °C. Tudi relativno majhni porasti temperature v ustni votlini lahko znatno spremenijo ekspresijo bakterijskih genov in tako konkurenčnost posameznih vrst v mikrobnih združbi (1).

Ustna votlina omogoča rast različnih mikrobnih skupnosti, saj sestava mikrookolja v ustni votlini lahko zadovolji zahtevam mnogih prehransko zahtevnih bakterij. Hranila so na voljo v obliki endogenih virov (npr. slina, ki vsebuje aminokislino, peptide, proteine, glikoproteine in vitamine) ali eksogenih virov (zaužita hrana) (1,8). Prehrana ima pomemben vpliv na razvoj bakterij in kemijsko sestavo biofilma v ustni votlini. Še posebej pomemben vpliv na ekologijo ustne votline imajo fermentirani ogljikovi hidrati (sladkorji). Pogosto uživanje ogljikovih hidratov je lahko povezano s spremembo deleža mikrobiote v zobnem biofilmu. Poveča se število bakterij, ki tolerirajo kislo okolje, zlasti streptokokov in laktobacilov, medtem ko se rast kislinsko občutljivih bakterij zmanjša (npr. *S. sanguinis* in *S. gordonii*). Presnova se spremeni, tako da prevladujoči produkt fermentacije postane laktat (8). Takšne lokalne spremembe v mikrobioti in metabolizmu bakterij lahko odločilno vplivajo na mesto nastanka zobnega kariesa. Študije so pokazale, da ima hrana bogata z glukozo ali saharozo

majhen vpliv na začetni razvoj biofilma. Vendar pa takšna hrana vpliva na delež različnih bakterijskih vrst v biofilmu tekom njegovega razvoja (9). Na ekologijo v ustni votlini vplivajo tudi mleko in mlečni izdelki (npr. sir). Uživanje mleka ali mlečnih izdelkov lahko ščiti zobe pred nastankom kariesa. Mlečni proteini in derivati kazeina se adsorbirajo na zobno površino in s tem zmanjšajo adhezijo streptokokov ter povečajo remineralizacijo zob (proces obnove mineralov v zobni sklenini) (1).

Še eden pomemben dejavnik za rast mikroorganizmov v ustni votlini je anaerobioza, kar pomeni sposobnost mikroorganizmov za rast v prisotnosti ali odsotnosti kisika. Večina mikroorganizmov je fakultativnih anaerobov (lahko rastejo v prisotnosti ali odsotnosti kisika) ali striktnih anaerobov (kisik je za te bakterije toksičen). Prav tako obstajajo dokazi o prisotnosti kapnofilnih (za rast potrebujejo CO₂) in mikroaerofilnih (za rast zahtevajo nizke koncentracije kisika) mikroorganizmov v ustni votlini. Večina kisika v ustni votlini je prisotna v slini, kjer je kisik raztopljen in takoj dostopen bakterijam. Redoks potencial v zdravih špranjah dlesni je okrog +70 mV in med vnetjem dlesni (gingivitisom) pade na -50 mV in pri napredovani parodontalni bolezni na -300 mV. Začetni (primarni) kolonizatorji porabljajo kisik in sproščajo CO₂ kot produkt metabolizma, pozni kolonizatorji pa sproščajo H₂ in druge reducirajoče snovi, kot so žveplove spojine in drugi fermentacijski produkti. Tako se redoks potencial zniža in omogoči rast in preživetje pretežno striktnih anaerobnih mikroorganizmov (1,10).

Gradient koncentracije kisika in redoks potenciala je še posebej opazen v "debelih" biofilmih. V zobnem biofilmu lahko torej rastejo bakterije z različnimi tolerancami na kisik. Na redoks potencial različnih mest v ustni votlini vpliva metabolizem prisotnih mikroorganizmov in sposobnost difuzije kisika skozi plasti biofilma. Tako lahko lokalne spremembe v redoks potencialu pomembno vplivajo na sestavo mikrobne skupnosti. Ta pristop lahko uporabimo za nadzor subgingivalnih biofilmov pri parodontalni bolezni, na primer s pomočjo snovi, ki dvignejo redoks potencial, se ustvarijo neugodni pogoji za striktno anaerobne bakterije (1).

1.1.3. Vloga oralnega mikrobioma pri ohranjanju zdravja

Mikroorganizme, ki jih najdemo v ustni votlini, lahko definiramo kot oralni mikrobiom. Ta izraz označuje ekološko skupnost komenzalnih, simbiotskih in patogenih mikroorganizmov v ustni votlini (11).

Oralna komezalna mikrobiota igra pomembno vlogo pri vzdrževanju oralnega kot tudi systemskega zdravja. Oralna komezalna mikrobiota označuje bakterije, ki so prisotne v normalni flori zdravega posameznika. Le-ta prispeva k prirojeni imunski obrambi, ki je osnovna bariera pred patogenimi mikroorganizmi. Prisotnost komezalne mikrobiote v ustih zavira kolonizacijo ustne votline s patogenimi mikroorganizmi (12). Mehanizmi, ki sodelujejo pri tem, vključujejo tekmovanje za hranila ali pa za mesta vezave. Ker vse površine v ustni votlini kolonizira komezalna mikrobiota, je na voljo zelo malo vezavnih mest za patogene mikroorganizme. Poleg tega je dodatni mehanizem, ki preprečuje kolonizacijo patogenih mikroorganizmov, tudi sproščanje inhibitornih metabolitov in oblikovanje neugodnih pogojev okolja za kolonizacijo. Bakterije v ustni votlini lahko spremenijo pH ali redoks potencial mikrookolja, proizvajajo hlapne maščobne kisline in vodikov peroksid, kar lahko zavre rast patogenih in oportunističnih mikroorganizmov, na primer vodikov peroksid, ki ga v majhnih količinah proizvaja *S. mitis* kot stranski produkt metabolizma, lahko zavre rast parodontalno patogenih bakterij v biofilmu, kot je npr. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (3). Nekatere komezalne bakterije kažejo velik antagonistični učinek proti oralno patogenim mikroorganizmom, na primer *S. salivarius* sev K12 proizvaja bakteriocin, ki zavira rast Gram negativnih bakterij, ki so povezane s parodontalno boleznijo in halitozo, kar potrjujejo tudi *in vitro/in vivo* študije (13,14).

Pomen komezalne mikrobiote v ustni votlini pride do izraza, kadar je le ta uničena, na primer zaradi zdravljenja s protimikrobnimi spojinami. V tem primeru lahko pride do različnih okužb z oportunističnimi patogeni vrst *Candida* in *Staphylococcus aureus* (15).

1.1.4. Mikrobiota ustnic

Velik del mikrobiote ustnic predstavljajo fakultativno anaerobni streptokoki. Prav tako sta v majhnem številu prisotni bakteriji *Veillonella* in *Neisseria* (manj kot 1 % kultivabilne mikrobiote). Najpogosteje izolirana bakterija je *S. vestibularis*. Občasno lahko izoliramo tudi tudi črno pigmentirane anaerobne bakterije (*P. melaninogenica*) in fuzobakterije (običajno so 3–4 vrste prisotne na tem območju). Tudi molekularne tehnike so potrdile prisotnost številnih streptokokov, zlasti *S. mitis*, *S. oralis* in *S. constellatus* (1). Bakterija *Simonsiella muelleri* kolonizira trdno nebo (8).

1.1.5. Mikrobiota sluznice lic

Streptokoki so prevladujoča skupina bakterij na ustni sluznici (bukalni sluznici), prevladuje vrsta *S. mitis*. Pogosto lahko izoliramo tudi bakterijo *Haemophilus parainfluenzae*. Obligatni anaerobi niso prisotni v velikem številu, čeprav najdemo tudi spirohete in druge gibljive mikroorganizme. Molekularne tehnike so potrdile prisotnost velikega števila streptokokov kot tudi bakteriji *Granulicatella* in *Gemella* spp.. Študije so pokazale prisotnost bakterij, ki so vpletene pri pojavu parodontalne bolezni (*A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* in *Tannerella forsythia*) (1).

1.1.6. Mikrobiota jezika

Jezik ima s svojo papilarno površino veliko površino in tako podpira visoko gostoto rasti raznolikih bakterijskih združb. Približno 20 vrst bakterij je prisotnih v tipičnem vzorcu, ki ga odvezemo s površine jezika. Streptokoki so najštevilčnejša skupina bakterij in predstavljajo približno 40 % celotne mikrobiote. Prevladujeta vrsti *S. mitis* in *S. salivarius*. Gram pozitivno bakterijo *Rothia mucilagenosa* lahko izoliramo iz ustne votline skoraj izključno s površine jezika. Ostale glavne skupine bakterij (in njihovi deleži) vključujejo *Veillonella* spp. (16 %), Gram pozitivne paličaste bakterije (16 %), med katerimi prevladujeta *A. naeslundii* in *A. odontolyticus*, ter hemofilije (15 %). Izoliramo lahko tudi pigmentirajoče (*P. intermedia*, *P. melaninogenica*) in nepigmentirajoče anaerobne bakterije (1). Drugih mikroorganizmov vključno z laktobacili, kvasovkami, fuzobakterijami, spirohetami in drugimi premikajočimi se bakterijami je na jeziku manj kot 1 % celotne mikrobiote. Z mikrobioto na jeziku je povezan slab zadah. Večje število Gram negativnih bakterij (rodovi *Porphyromonas*, *Prevotella* in *Fusobacterium*) so izolirali z jezikov ljudi s slabim zadahom (16).

1.1.7. Mikrobiota sline

Ustna votlina je ves čas navlažena s slino, ki ima velik vpliv na ekologijo v ustni votlini in pomembno vlogo pri ohranjanju zdravih zob (17). Slina tvori 0,1 mm debel film po vsej notranji površini ustne votline. Slina je v glavnem sestavljena iz vode in vsebuje le 0,5 % trdnih snovi. Glavne organske sestavine v slini so proteini in glikoproteini, kot so amilaza, mucin, imunoglobulini, lizocim in laktoferin, ki delujejo protimikrobno (18). Te snovi v slini omogočajo nadzor kolonizacije ustne votline z bakterijami, glivami in ostalimi mikroorganizmi. Imunoglobulini (IgA, IgG in IgM) v slini so pomembni obrambni mehanizem pri virusnih okužbah ustne votline (3). Izmed anorganskih sestavin sline sta

pomembna kalcij in fosfat, ki omogočata remineralizacijo sklenine (18). Slina ima pomembno vlogo pri ohranjanju zdravih zob, saj odstranjuje hrano in nevtralizira kislino, ki je posledica bakterijske presnove ogljikovih hidratov v ustni votlini (1).

Slina vsebuje do 10^8 mikroorganizmov v mL, vendar nima svoje lastne mikrobiote. Požiranje zagotavlja, da se bakterije s slino ves čas odstranjujejo iz ustne votline. Mikroorganizmi, ki jih najdemo v slini, izvirajo z drugih površin v ustni votlini, njihova sestava pa zavisi tudi od ustne higiene in žvečenja. Z epitelija ustne votline se v slino sproščajo različne bakterije, zato mikrobiom sline vsebuje veliko število bakterijskih združb, pri čemer prevladujeta rodova *Prevotella* in *Streptococcus* (19). Število streptokokov (predvsem skupine mutans) in laktobacilov v slini je lahko kazalnik za dovzetnost posameznika za nastanek kariesa. Pri ljudeh z visokim številom potencialno kariogenih bakterij v ustni votlini je tveganje za nastanek kariesa večje (1).

1.1.8. Mikrobiota zob

Pogoji okolja na površini zob niso enotni, kar se odraža v sestavi mikrobne skupnosti. Mikrobna skupnost na zobeh je definirana kot zobni biofilm. Zobje so trdna površina, ki ima prisotno največje število mikroorganizmov glede na ostala mesta v ustni votlini. Tipičen vzorec plaka (bakterijskega biofilma) vsebuje okrog 20 bakterijskih vrst. Bakterije iz rodu *Actinomyces* so med glavnimi skupinami bakterij, ki jih najdemo v zobnem biofilmu (1). Bakterije *R. dentocariosa*, *S. sanguinis*, *S. gordonii* in *Abiotrophia defectiva* preferenčno kolonizirajo zobni biofilm. V primerjavi s površino sluznice ustne votline in jezika je število bakterij *S. salivarius* na površini zob manjše (8). V špranjah dlesni najdemo predvsem obligatne anaerobne bakterije in spirohete. Velik delež bakterij spada v skupino bakterij, ki jih (še) ne znamo gojiti v laboratoriju. Molekularne tehnike so pokazale, da so streptokoki predominantni zgodnji kolonizatorji biofilma, odkrili so pa tudi predstavnike rodov *Actinomyces*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Rothia* in *Veillonella* (1).

1.2. POMEN IN NASTANEK ZOBNEGA BOFILMA

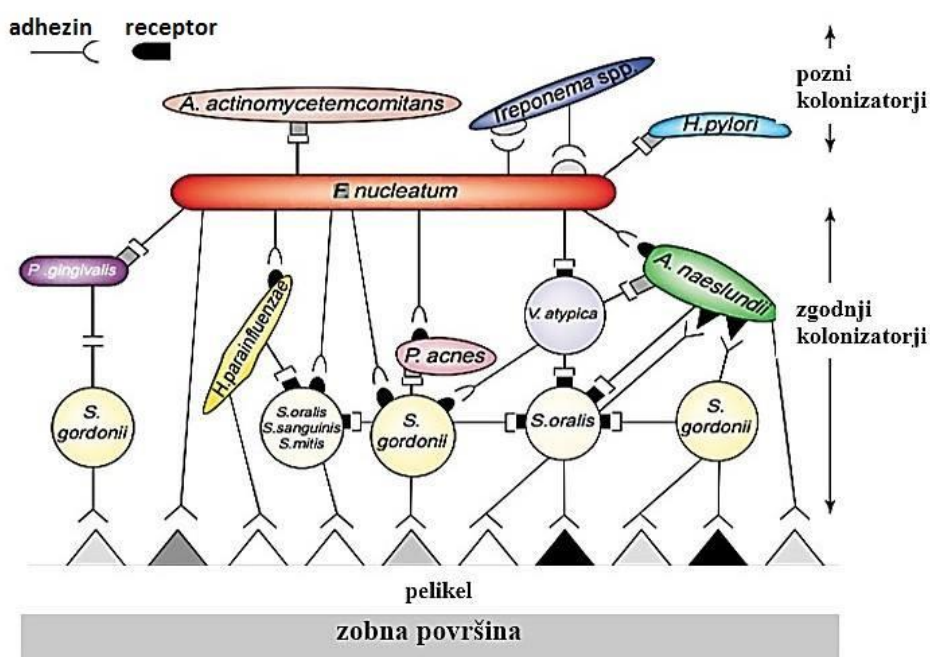
Ustna votlina človeka je okolje z različnimi površinami (trdna in mehka tkiva) in veliko raznolikostjo hranil. Zagotavlja optimalno temperaturo in vlago za rast bakterij kar vodi v neizogiben nastanek bakterijskega biofilma (20). Zobje so edina trdna površina v ustni votlini, ki omogoča nastanek bakterijskega biofilma. Bakterije, ki se nahajajo v skupnosti obdani z glikokaliksom, tvorijo biofilm, ki omogoča bakterijam, da se razmnožujejo na različnih površinah (10). Biofilm ščiti bakterije pred toksičnimi snovmi iz okolja, omogoča dovajanje hranil in odvajanje produktov metabolizma ter tako ustvarja mikrookolje, ki je ugodno za rast bakterij (21). Biofilmi, ki naseljujejo ustno votlino, so zelo kompleksni, saj v ustih obstajajo različne ekološke niše (4). Ekološka niša je definirana kot skupna celota okolja organizma, njegovega položaja v prehranjevalni verigi in njegove funkcionalne vloge (22).

Nastanek biofilma je proces, ki ga lahko razdelimo v več ključnih korakov:

1. Takoj po čiščenju zob se na površino zob adsorbira kompleksna mešanica organskih spojin, ki tvorijo film, ki se imenuje pelikel. Pelikel prekriva površino zob in je sestavljen iz polimerov in proteinov iz hrane in sline (23). Prvi korak v procesu nastajanja zobnega biofilma vključuje začetno pritrditev bakterijskih celic na površino (20). Bakterije običajno s pasivnim transportom (tokom sline) pripotujejo na površino zoba (23). Prve bakterije, ki kolonizirajo pelikel, so Gram pozitivne bakterije, kot so streptokoki (*S. mitis*, *S. sanguinis* in *S. oralis*) in *Actinomyces* spp. Manjšo vlogo v prvih korakih v procesu nastajanja zobnega biofilma imajo bakterije iz drugih rodov, kot so *Neisseria*, *Granulicatella*, *Corynebacterium* in *Rothia*, najverjetneje zaradi njihovega majhnega števila v slini. Začetna adhezija bakterij je posledica fizikalno-kemijskih interakcij med celicami in površino zoba prekrito s peliklom. Sledi povezava z Van der Waalsovimi in kovalentnimi vezmi na površino zoba preko posebnih adhezinov na bakterijski površini, ki se vežejo na receptorje na površini pelikla (23,24).
2. Drugi korak je transformacija bakterijskih celic iz planktonske oblike (prosto plavajoče/gibljive) v pritrjeno obliko, ki omogoča nastanek biofilma. V tem koraku se geni, ki so pomembni za planktonsko rast, prenehajo izražati in začnejo se izražati geni, ki so ključni za rast in nastanek biofilma (20).

3. Tretji korak je rast in oblikovanje strukture biofilma s kontrolirano delitvijo in propadom bakterijskih celic zaradi zunanjih dejavnikov (20). Biofilm raste in se spreminja kot odraz različnih procesov: celične delitve in rasti bakterij, odcepljanja bakterij iz biofilma na drugih površinah in pritrjanja novih bakterijskih celic iz okolja na obstoječi biofilm (25). Po 24 urah zobni biofilm vsebuje veliko število morfološko različnih vrst bakterij, ki med seboj koagregirajo in tvorijo posebne kompleksne strukture (podobne strukturi koruznega storža). V tej fazi biofilm privlači in veže tudi druge kolonizatorje, kot so *Capnocytophaga* in anaerobne bakterije (fuzobakterije, *Prevotella*, *Propionibacterium*) (26). Poznamo dva izraza, ki sta pomembna v razvoju biofilma, to sta koadhezija in koagregacija. Koadhezija je interakcija med celicami, ki so že pritrjene na površino, in celicami v suspenziji. Pogosto se pojavi med celicami v biofilmu in bakterijskimi agregati v suspenziji. Koagregacija je proces, kjer se različni mikroorganizmi vežejo na predhodno vezane mikroorganizme. Koagregacija je definirana kot specifično prepoznavanje med celicami, ki so si med seboj genetsko različne (24). V raziskavi sta Kolenbrander in London opisala koagregacijo z naslednjim modelom. Začetni kolonizatorji se vežejo na receptorje na peliklu na zobni površini. Vsak nov pritrjeni kolonizator postane tako nova površina in služi kot most za naslednjega kolonizatorja. Anaerobna bakterija *F. nucleatum* ima vlogo mosta med zgodnjimi in poznimi kolonizatorji. Zgodnji kolonizatorji so Gram pozitivne bakterije, ki jih najdemo v zobnem biofilmu zdravih oseb. Pozni kolonizatorji so večino Gram negativne parodontalno patogene bakterije, kot so *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* in *Treponema* spp. (Slika 1) (26). Povezovanje med bakterijami je zelo specifično, pri čemer lahko primarni kolonizatorji koagregirajo med seboj, medtem ko s sekundarnimi kolonizatorji ne morejo. Tudi sekundarni kolonizatorji koagregirajo z bakterijo *F. nucleatum*, medtem ko medsebojnih interakcij med njimi ni opaziti. Bakterija *F. nucleatum* je nekakšen povezovalni organizem, ker lahko koagregira tako s primarnimi kot sekundarnimi kolonizatorji (27). V odsotnosti *F. nucleatum* veliko sekundarnih kolonizatorjev ne more postati del biofilma, ker sekundarni kolonizatorji ne morejo koagregirati s primarnimi kolonizatorji (28). Prav tako sekundarni anaerobni kolonizatorji ne morejo preživeti v planktonskem stanju. Tako je bakterija *F. nucleatum*, zaradi svojih koagregacijskih sposobnosti ključna pri razvoju zobnega biofilma (29).

- Četrty korak je zorenje biofilma, pri čemer nastajajo vodni kanalčki in celice, ki tvorijo strukturo "gobe" (20). Ko se biofilm oblikuje, se njegovo zorenje ustavi in se vzpostavi stanje dinamičnega ravnovesja, v katerem sta bakterijska rast in adhezija uravnoveženi z odstranjevanjem delov biofilma z mehanskimi procesi v ustni votlini (30).
- Peti korak vključuje regulirano odstranjevanje celic ali celičnih aglomeratov iz biofilma (20). Bakterije v biofilmu lahko biofilm zapustijo zaradi različnih razlogov, kot so stradanje, odziv na inter ali intra-bakterijsko komunikacijo ali zaradi fizikalno-kemijskih signalov iz okolja (30).



Slika 1: Shematski prikaz nastanka biofilma (31).

1.3. PARODONTALNA BOLEZEN

Parodontalna bolezen je kronična bakterijska infekcijska bolezen in običajno skupaj z gingivitisom, ki je reverzibilno vnetje dlesni, povzroči nepopravljivo uničenje obzobnih tkiv, ki obkrožajo zob, vključno s čeljustno kostjo (32). Parodontalna bolezen je opredeljena kot stanje, kjer je podporno tkivo zob uničeno, kar vodi do recesije dlesni, razgradnje parodontalnega ligamenta, izgube kolagena dlesni in v zadnji fazi bolezn do razgradnje čeljustne kosti in izgube zob. Trda in mehka tkiva v ustni votlini kolonizira bakterijski biofilm, sestavljen iz proteinov, epitelijskih celic, ostankov hrane, encimov in bakterij, ki povzročajo zobno gnilobo in parodontalno bolezen (33–36).

Poznamo več oblik parodontalne bolezni. Dve najpogostejši obliki, ki prizadeneta drugače zdrave posameznike, sta agresivna parodontalna bolezen in kronična parodontalna bolezen. Za agresivno parodontalno bolezen je značilna hitra razgradnja čeljustne kosti. Le-ta se pojavi predvsem pri otrocih in najstnikih. Kronična parodontalna bolezen je počasi napredujoča bolezen, ki prizadene pretežno odrasle, vendar se lahko pojavi tudi pri otrocih. Obseg prizadetega tkiva korelira s količino prisotnega zobnega biofilma (1).

Poleg parodontalno patogenih mikroorganizmov, prispevajo k razvoju te bolezni tudi genetski in okoljski dejavniki. Tveganje za bolezen povečujejo tudi naslednji dejavniki: kajenje, sistemske bolezni, določena zdravila (npr. steroidi, antiepileptiki, zdravila za zdravljenje raka), neustrezna ustna higiena, zobni vsadki, neustrezne plombe in prevleke, nosečnost in uporaba hormonske kontracepcije. Poleg teh dejavnikov k razvoju te bolezni prispeva še splošno zdravstveno stanje osebe. Bolezni, ki sprožijo imunske obrambne mehanizme kot so AIDS in bolezni imunskega sistema, lahko vodijo v razvoj parodontalne bolezni (4).

1.3.1. Parodontalno patogene bakterije

Eksperimentalni in klinični dokazi potrjujejo, da nekateri bakterijski sevi v obzobnih tkivih lahko povzročijo vnetje dlesni in razgradnjo čeljustne kosti. Te bakterije so definirane kot parodontalno patogene bakterije. Večina parodontalno patogenih bakterij je anaerobnih, vendar se lahko v biofilmu pojavijo tudi fakultativno anaerobne, kapnofilne in mikroaerofilne parodontalno patogene bakterije (37).

Čeprav obstajajo dokazi, da bakterijski biofilm igra pomembno vlogo v etiologiji parodontalne bolezni, pa še ni jasno, ali bakterije sprožijo bolezen specifično ali nespecifično. Poznane so tri hipoteze o vlogi bakterij pri parodontalni bolezni (38).

Nespecifična hipoteza pravi, da vse bakterije iz zobnega biofilma igrajo pomembno vlogo pri nastanku bolezni (1). To pomeni, da nobena bakterijska vrsta ni specifična povzročiteljica parodontalne bolezni. Zaključek te hipoteze je, da je potrebno vzdrževati zelo dobro ustno higieno, da se bolezen prepreči, saj imajo vse bakterije v biofilmu pomembno vlogo pri razvoju parodontalne bolezni (38).

Specifična hipoteza pravi, da je parodontalna bolezen posledica okužbe z določenimi, specifičnimi vrstami patogenih bakterij. Le-ta razloži, zakaj obstaja veliko bolnikov, ki imajo velike količine zobnega biofilma, a se le pri redkih razvije huda oblika parodontalne

bolezni (38). Zaključek te hipoteze je, da je potrebno odpraviti samo tiste bakterijske vrste, ki so odgovorne za pojav parodontalne bolezni, in ne ostalih bakterijskih vrst (1).

Ekološka hipoteza usklajuje ključne elemente prejšnjih dveh hipotez. Pravi, da so mikroorganizmi, povezani z boleznijo, prisotni na zdravih mestih, vendar je njihovo število premajhno, da bi bili klinično pomembni. Bolezen je posledica premika v mikrobioti kot odgovor na spremembo lokalnih okoljskih pogojev (spremembe pH-ja, prisotnosti kisika itd.). Na primer vnetni odziv na kopičenje zobnega biofilma okrog dlesni povzroči povečan pretok gingivalne tekočine, ki stimulira rast obligatnih anaerobnih bakterij, ki prevladujejo pri parodontalni bolezni (1,8).

Dokazano je bilo, da nastop in napredovanje vnetja, ki vodi v pojav destruktivnih parodontalnih lezij, ni povezan le s prisotnostjo parodontalno patogenih bakterij, ampak zavisi tudi od pomanjkanja ali minimalnega deleža parodontalno koristnih bakterij. Pomembno je poudariti, da se parodontalna bolezen prične s prisotnostjo relativno majhnega števila parodontalno patogenih mikroorganizmov v zobnem biofilmu (39).

Parodontalno patogene bakterije so odgovorne za stimulacijo gostiteljevega imunskega sistema, ki spremeni tkivo in povzroči parodontalne lezije (40). Da bakterije postanejo patogene, morajo biti sposobne kolonizirati subgingivalna področja in biti sposobne sproščati virulentne dejavnike, ki neposredno (encimi, toksini) ali posredno (antigeni, aktivatorji) povzročijo vnetje in destruktivne poškodbe obzobnih tkiv (41). Bakterije lahko proizvajajo dejavnike, ki so pomembni za pritrnitev na trdne površine, kot so adhezini, lektini in fimbrije. Vnetni dejavniki, ki neposredno poškodujejo okoliška tkiva, so alkalne in kisle fosfataze, maščobne in organske kisline, IgG in IgA proteaze in toksični produkti (endotoksini, mukopeptidi iz bakterijske celične stene in končni produkti metabolizma, kot sta H₂S in CH₄). Gibljivost bakterij je prav tako pomembna lastnost nekaterih patogenih bakterij, saj jim omogoča, da napadejo epitelij in vezivna tkiva (npr. spirohete). Invazivne lastnosti so odkrili pri številnih bakterijah zobnega biofilma npr. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* in *F. nucleatum* (42).

Patogenost nekaterih bakterijskih vrst je določena na osnovi klasičnih Kochovih postulatov (predpostavk), ki jih je modificiral Socransky: povezava z boleznijo, uspešno zdravljenje kliničnih znakov, patogeneza v živalskih modelih (zmožnost povzročiti bolezen pri poskusnih živalih), indukcija gostiteljevega imunskega sistema z bakterijami ali njihovimi

komponentami v obzobnih tkivih in sproščanje neposrednih ali posrednih virulentnih dejavnikov. Na podlagi tega sta *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in *Porphyromonas gingivalis* dve vrsti, ki izpolnjujeta vsa zgornja merila in sta tako uvrščeni med parodontalno patogene seve. Ostali sevi, ki naj bi bili prav tako parodontalno patogeni, so *T. denticola*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros* in *Selenomonas* spp.. Na podlagi znanstvenih dokazov sta Socransky in Haffajee razvrstila mikroorganizme v bakterijske komplekse, odvisno od njihove prisotnosti v biofilmu in subgingivalnem področju ter njihove vpletenosti (funkcije) v patogenezo parodontalne bolezni, kar prikazuje preglednica I (21).

Preglednica I: Razvrstitev mikroorganizmov v bakterijske komplekse.

BAKTERIJSKA VRSTA	KOMPLEKS
<i>Actinomyces</i> <i>Veillonella</i>	Vijolični kompleks
<i>Streptococcus: gordonii, intermedius, mitis, sanguis</i>	Rumeni kompleks
<i>Capnocytophaga</i> <i>E. corrodens</i>	Zeleni kompleks
<i>Campilobacter rectus</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>P. micros</i> <i>P. intermedia</i>	Oranžni kompleks
<i>T. forsythia</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. denticola</i>	Rdeči kompleks
<i>A. Actinomycetemcomitans</i> <i>Selenomonas</i>	Nerazvrščene bakterije

Bakterije v vijoličnem, rumenem in zelenem kompleksu so prisotne v zdravem obzobnem tkivu. Bakterije rdečega in oranžnega kompleksa in nerazvrščene bakterije pa so potencialno parodontalno patogene bakterije. Pomembno je poudariti, da ni ključna samo prisotnost teh vrst, ampak tudi različnost sevov (43).

1.3.1.1. Bakterija *Porphyromonas gingivalis*

Gram negativna bakterija *P. gingivalis* je negibljiva, paličasta, asaharolitična (ne metabolizira ogljikovih hidratov) in striktno anaerobna bakterija. Povezana je z začetkom in napredovanjem razgradnje obzobnih tkiv. Ima kapsulo, ki jo ščiti pred fagocitozo, in fimbrije, ki ji omogočajo adhezijo. Proizvaja veliko število virulentnih dejavnikov, npr. proteaze (za razgradnjo imunoglobulinov in faktorjev komplementa), kolagenazo, hemolizin, endotoksin, maščobne kisline in različne pline kot sta H₂S in CH₄) (42).

1.3.1.2. Bakterija *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Gram negativna bakterija *A. actinomycetemcomitans* je kratka paličasta bakterija z zaobljenimi konci. Bakterija je močno povezana z destruktivni spremembami obzobnih tkiv. Izolirali so jo iz aktivnih lezij pri kronični parodontalni bolezni in agresivni parodontalni bolezni. Bakterija v okolje izloča številne virulentne dejavnike, npr. levkotoksin (naredi pore v nevtrofilcih, monocitih in nekaterih limfocitih), kolagenazo (razgrajuje vezivno tkivo), proteaze (lahko cepi IgG), lipopolisaharid, inhibitor fibroblastov in dejavnike, ki inducirajo resorpcijo kosti. Znanih je pet serotipov in veliko biotipov, ki temeljijo na razlikah v polisaharidni sestavi lipopolisaharida (44).

1.4. ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI

1.4.1. Tradicionalno zdravljenje

Terapevtske strategije zdravljenja parodontalne bolezni so usmerjene predvsem na preprečevanje pojava bolezni, kar zahteva dobro ustno higieno. Po nastopu bolezni zdravljenje vključuje luščenje (odstranjevanje zobnih oblog in zobnega kamna) in brušenje korenin (glajenje grobe površine korenin), s čimer se prepreči dodatna adhezija in rast parodontalno patogenih bakterij. Kadar je potrebno, se opravi tudi kirurški poseg s katerim odpravijo parodontalne žepe ali odstranijo obolele zobe, s čimer se prepreči širjenje bolezni (45). Za zdravljenje agresivnih oblik parodontalne bolezni se uporabljajo tudi antiseptiki, kot je npr. klorheksidin, in antibiotiki, kot sta npr. metronidazol in tetraciklin (46). Z uporabo antibiotikov je povezanih več nezaželenih učinkov, vključno s preobčutljivostnimi reakcijami in prebavnimi težavami. Vedno večji problem postaja tudi odpornost bakterij na antibiotike (47).

1.4.2. Zdravljenje s probiotiki

Ustna votlina je potencialno mesto za uporabo probiotikov (48). Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki ugodno vplivajo na zdravje posameznika. Ključno za mikroorganizem s probiotičnim učinkom v ustni votlini je, da je sposoben preživeti v pogojih, ki vladajo v ustni votlini, da se je sposoben pritrčiti na površino, ki je ves čas v stiku s slino, in kolonizirati površine v ustni votlini ter tako preprečiti rast oralnih patogenov. Potencialni probiotični mikroorganizem mora biti tudi varen za gostitelja. Uporaba probiotikov lahko na dva načina prispeva k zdravljenju parodontalne bolezni: (i) omogoči odstranitev specifičnih parodontalno patogenih mikroorganizmov in (ii) spremeni gostiteljev imunski odziv (49).

Probiotiki lahko zavirajo rast specifičnih patogenih bakterij, tako da zavirajo njihovo adhezijo, kolonizacijo in nastanek biofilma ali z izločanjem različnih snovi, kot so organske kisline, vodikov peroksid in bakteriocini. Na gostiteljev imunski odziv lahko vplivajo z zaviranjem gostiteljeve kolagenaze, indukcijo ekspresije zaščitnih proteinov na površini gostiteljskih celic in modulacijo imunskega odziva (50).

V ustni votlini so probiotični mikroorganizmi že naravno prisotni. V raziskavah so predvsem preučevali probiotične mikroorganizme, ki jih najdemo v slini, kot so laktobacili, vrste *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri* in *Lactobacillus fermentum*. Bistvenih razlik v njihovem številu pri zdravih posameznikih in posameznikih s parodontalno boleznijo niso odkrili (51). Laktobacile redko najdemo v subgingivalnih vzorcih in pri osebah s kroničnim parodontitisom, kar kaže, da subgingivalno področje ni habitat laktobacilov (52). Najbolj preučevan probiotični mikroorganizem *L. rhamnosus GG* naj ne bi bil sposoben permanentno preživeti v ustni votlini. Kljub temu obstajajo raziskave, ki kažejo, da z rednim uživanjem izdelkov s probiotiki, le-ti postanejo sposobni dlje časa preživeti v ustni votlini (53).

V manjšem številu najdemo v slini tudi bifidobakterije, katerih sestava se razlikuje med zdravimi posamezniki in posamezniki s parodontalno boleznijo, kar kaže, da so te bakterije povezane z zdravjem ustne votline. Na sestavo bifidobakterij v ustni votlini lahko vpliva periodontalni status in/ali starost posameznika. Bifidobakterije *B. dentium*, *B. adolescentis*, *B. urinalis* in *B. longum*. *B. adolescentis*, *B. urinalis* in *B. longum* prevladujejo v ustni votlini zdravih oseb, medtem ko *B. dentium* najdemo tako pri zdravih posameznikih kot posameznikih s parodontalno boleznijo. *B. adolescentis* se bolj pogosto pojavlja pri mladih zdravih posameznikih (51).

2. NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je izolirati probiotične bakterijske seve iz ustne votline, ki ne spadajo v skupino bakterij s sposobnostjo laktatne fermentacije, »laktobakterij«, zaradi potencialnega vpliva na nastanek zobnega kariesa, in ki delujejo protimikrobno proti parodontalno patogeni bakteriji *A. actinomycetemcomitans*. V ta namen bomo najprej razvili ustrezen protokol vzorčenja ustne votline posameznikov, izvedli vzorčenje in testirali protimikrobno delovanje izoliranih bakterijskih sevov na bakteriji *E. coli* in *A. actinomycetemcomitans*. V zadnjem koraku bomo s PCR analizo identificirali bakterijske seve s protimikrobnim učinkom na *E. coli* in *A. actinomycetemcomitans*.

Postavili smo naslednje hipoteze:

- Bakterijski sevi izolirani iz ustne votline posameznikov z manjšim številom zalivk na zobeh imajo večji protimikrobni učinek na parodontalno patogene bakterije kot bakterijski sevi iz ustne votline posameznikov z večjim številom zalivk.
- Bakterijski sevi s protimikrobnim učinkom, izolirani s popoldanskim vzorčenjem po večkratnem vnosu hrane in prisotnostjo razvitega biofilma na površinah ustne votline (sluznice, zobje, jezik), imajo večji protimikrobni učinek na parodontalno patogene bakterije kot bakterijski sevi izolirani z jutranjim vzorčenjem.
- Največ sevov s protimikrobnim učinkom lahko izoliramo s površine zob.

3. MATERIALI IN METODE

3.4. Materiali

3.4.1. Laboratorijska oprema

V laboratoriju smo med raziskavo uporabili naslednjo laboratorijsko opremo:

- Anaerobni lonci
- Analitska tehtnica Kern, AIS 120-4N
- Avtoklav Kambič A-21CA
- Avtoklavirni lonec Certoclav-Tisch-Autoclav CV-EL 12L/18L
- Biometra TProfessional Thermocycler, Biometra
- Centrifuga Sigma 2-16K
- Digestorij
- DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR, Biosan
- Hladilnik (4 °C) Gorenje
- Inkubator Memmert / Biosan / Environmental shaker-incubator ES-20
- Magnetni mešalnik Rotamix SHP-10
- Naprava Millipore za pripravo miliQ vode, ThermoFisher Scientific
- Pečica z grelno ploščo Luxell
- pH meter Hanna instruments HI 221
- Ultrazvočna kadička Elma S 40H, Elmasonic
- Vortex Assistent 2789/2
- Zamrzovalnik (-20 °C) Gorenje
- Zamrzovalnik (-80 °C) Gorenje

3.4.2. Kemikalije in reagenti

V laboratoriju smo med raziskavo uporabili naslednje kemikalije in reagente:

- 0,5 M EDTA (pH = 8), Fluka
- 10X Pufra Taq, ThermoFisher Scientific
- Agar, Fluka
- Agaroza, Sigma-Aldrich
- Borova kislina, Fluka
- $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich,
- Chelex[®]100 Resin, Bio-rad
- D-(+)-Celobioza, Fluka
- D-(+)-Glukoza, Sigma-AldrichD-(+)-Maltoza monohidrat, Sigma-Aldrich
- Destilirana voda, Toplarna TeTOL
- dNTP-ji, Fermentas
- Dušik, Messer UN 1066
- Etilni alkohol, denaturirani 96 %, Stella t.e.c.h ECP
- Glicerol, Sigma-Aldrich
- Hemin, Sigma-Aldrich
- K_2HPO_4 , Sigma-Aldrich
- Kaziton, Sigma-Aldrich
- KH_2PO_4 , Fluka
- Kvasni ekstrakt, Fluka
- Lambda DNA/Pst, Fermentas
- L-Cistein hidroklorid, Sigma-Aldrich
- Loading Dye, Fermentas
- Medij Brain heart infusion (BHI), Sigma-Aldrich
- Medij Nutrient broth (NB), Sigma-Aldrich
- Mesni ekstrakt, Sigma-Aldrich
- MgCl_2 , Fermentas
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich
- MiliQ voda, Toplarna TeTOL
- NaCl, Riedel-de Haën

- NaHCO₃, Fluka
- NaOH, Merck
- Ocetna kislina, Gram-Mol
- Oligonukleotidni začetnik 1492R, Fermentas
- Oligonukleotidni začetnik 27F, Fermentas
- Pepton, Sigma-Aldrich
- Resauzrin, Sigma-Aldrich
- Sybr green I, Sigma-Aldrich
- Škrob, topen v vodi, Sigma-Aldrich
- Taq polimeraza, Fermentas
- Triptikazni pepton, Sigma-Aldrich,
- Tris baza, Sigma-Aldrich
- Tween 80, Sigma-Aldrich
- Vitamin K₁, Sigma-Aldrich
- Želatina razgrajena z encimi trebušne slinavke, Fluka

3.4.3. Biološki material

V raziskavi smo uporabili naslednje bakterijske seve *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* Knorr 1922 (DSM-15643, ATCC 25586), *Porphyromonas gingivalis* (Coykendall et al. 1980) Shah and Collins 1988 (DSM-20709, ATCC 33277) in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Klinger 1912) (DSM-8324, ATCC 33384) (okrajšava: *A. actinomycetemcomitans* oz. *A.a*), ki smo jih naročili z inštituta DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Uporabili smo še bakterijski sev *Escherichia coli* TOP 10 (Thermo Fisher) (okrajšava: *E. coli*).

3.4.4. Pufer, raztopine in gojišča

3.4.4.1. Raztopine in pufer

1. Fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)

NaCl.....9 g
dH₂O.....1000 mL

Raztopili smo 9 g NaCl v 700 mL destilirane vode in dopolnili do 1000 mL. Fiziološko raztopino smo sterilizirali z avtoklaviranjem (20 min, 121 °C, nadtlaku 1,3 bar).

2. Raztopina hemina

Raztopili smo 50 mg hemina v 1 mL 1M NaOH in dopolnili z destilirano vodo do 100 mL. Raztopino smo filtrirali skozi sterilni filter (0,22 µm). Raztopino smo do uporabe shranjevali v hladilniku.

3. Raztopina vitamina K₁

Raztopili smo 0,1 mL vitamina K₁ v 20 mL 95 % etanola. Raztopino smo filtrirali skozi sterilni filter (0,22 µm). Raztopino smo do uporabe shranjevali v hladilniku.

4. Raztopina soli za PYG gojišče

CaCl ₂ × 2 H ₂ O.....	0,25 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O.....	0,50 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
NaHCO ₃	10,00 g
NaCl.....	2,00 g
dH ₂ O.....	1000 mL

Posamezne sestavine smo natehtali v čašo in dodali destilirano vodo do volumna 1000 mL. Raztopino smo do uporabe shranjevali v hladilniku.

5. Pufer 50X TAE za gelsko elektroforezo (Tris acetatni pufer)

Tris baza.....	242 g
Brezvodna očetna kislina.....	57,1 g
0,5 M EDTA (pH = 8,0).....	100 mL
MiliQ voda.....	do 1000 mL

Najprej smo pripravili založno raztopino 0,5 M EDTA, tako da smo natehtali 93,05 g EDTA-dinatrijeve soli, dodali 400 mL miliQ vode in z NaOH uravnali pH raztopine na 8,0. Po umeritvi pH-ja smo dopolnili merilno bučko z miliQ vodo do oznake 500 mL. Sledila je priprava tris acetatnega pufera. Natehtali smo navedeno količino Tris baze in jo raztopili v 750 mL miliQ vode. Nato smo dodali brezvodno očetno kislino in 0,5 M EDTA ter dopolnili z miliQ vodo do končnega volumna 1000 mL.

3.4.4.2. Gojišča

1. Gojišče BHI (ang. brain-heart infusion)

Sestava osnovnega medija:

Ekstrakt možganov (ang. brain infusion solids)	12,5 g
Ekstrakt govejega srca (ang. beef heart infusion solids).....	5,0 g
Peptokompleks.....	10,0 g
Glukoza.....	2,0 g
NaCl.....	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g

Priprava končnega medija:

Osnovno gojišče BHI.....	37 g
dH ₂ O.....	1000 mL
(Agar).....	15 g

Sestavine osnovnega medija BHI smo natehtali v erlenmajerico, dodali ustrezen volumen destilirane vode in mešali na magnetnem mešalu, dokler se sestavine niso raztopile. pH gojišča smo umerili z NaOH na 7,4. Kadar smo pripravljali trdno gojišče, smo v medij dodali še agar. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu (20 min, 121 °C, nadtlaku 1,3 bar). Gojišče smo uporabili za izolacijo bakterij iz ustne votline in gojenje bakterije *A. actinomycetemcomitans*.

2. Gojišče hranilni bujon (ang. nutrient broth, NB)

Sestava osnovnega medija:

Pepton.....	5 g
Mesni ekstrakt.....	1 g
Kvasni ekstrakt.....	2 g
NaCl.....	5 g

Priprava končnega medija:

Osnovni medij NB.....	13 g
dH ₂ O.....	1000 mL
(Agar).....	15 g

Sestavine osnovnega medija NB smo natehtali v erlenmajerico, dodali ustrezen volumen destilirane vode in mešali na magnetnem mešalu, dokler se sestavine niso

raztopile. pH gojišča smo umerili z NaOH na 7,4. Kadar smo pripravljali trdno gojišče, smo v medij dodali še agar. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu (20 min, 121 °C, nadtaku 1,3 bar). Gojišče smo uporabili za izolacijo bakterij iz ustne votline in za shranjevanje zamrznjenih bakterijskih sevov (na -20 °C).

3. Gojišče Emerson

Sestava osnovnega medija Emerson:

Glukoza.....	10 g
Mesni ekstrakt.....	4 g
Želatina razgrajena z encimi trebušne slinavke	4 g
NaCl.....	2,5 g
Kvasni ekstrakt.....	1 g
dH ₂ O.....	1000 mL
(Agar).....	15 g

Vse sestavine smo natehtali v erlenmajerico, dodali ustrezen volumen destilirane vode in mešali na magnetnem mešalu, dokler se sestavine niso raztopile. pH gojišča smo umerili z NaOH na 7,4. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu (20 min, 121 °C, nadtaku 1,3 bar). Ko se je gojišče ohladilo, smo ga aseptično napolnili v petrijevke. Gojišče smo uporabili za izolacijo bakterij iz ustne votline.

4. Gojišče iz ovsenih kosmičev (ang. oat-flake)

Sestava osnovnega medija iz ovsenih kosmičev:

Ovseni kosmiči.....	30 g
dH ₂ O.....	1000 mL
(Agar).....	15 g

Ovsene kosmiče smo kuhali v destilirani vodi 10 minut. Tekočino z ovsenimi kosmiči smo ohladili in nato filtrirali, tako da smo dobili filtrat. pH gojišča smo umerili z NaOH na 7,4. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu (20 min, 121 °C, nadtaku 1,3 bar). Ko se je gojišče ohladilo, smo ga aseptično napolnili v petrijevke. Gojišče smo uporabili za izolacijo bakterij iz ustne votline.

5. Modificirano gojišče 104.PYG za gojenje anaerobnih mikroorganizmov

Triptikazni pepton.....	5 g
Pepton.....	5 g
Kvasni ekstrakt.....	10 g
Mesni ekstrakt.....	5 g
Glukoza.....	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Tween 80.....	1 mL
Cistein- HCl × H ₂ O.....	0,5 g
Resazurin.....	1 mg
Raztopina soli za gojišče PYG.....	40 mL
dH ₂ O.....	950 mL
Raztopina hemina.....	10 mL
Raztopina vitamina K ₁	0,2 mL
(Agar).....	15 mL

Sestavine smo natehtali v erlenmajerico, dodali destilirano vodo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se sestavine niso raztopile. Gojišče smo segrevali do vretja in prepihovali z dušikom 20 min tako, da smo dušik uvajali s plastično cevko, ki je bila priključena na jeklenko z dušikom. Nato smo gojišče ohladili in dodali cistein. pH gojišča smo umerili z NaOH na 7,2. Sledilo je 10 min prepihovanja z dušikom. Kadar smo pripravljali trdno gojišče, smo v medij, ki smo ga predhodno prepihali z dušikom, dodali agar. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu (30 min, 121 °C, nadtlaku 1,3 bar). Ko se je gojišče ohladilo, smo mu dodali raztopino hemina in vitamina K₁. Gojišče smo uporabili za gojenje bakterije *F. nucleatum*.

6. Mesni medij z ogljikovimi hidrati (ang. chopped meat medium with carbohydrates)

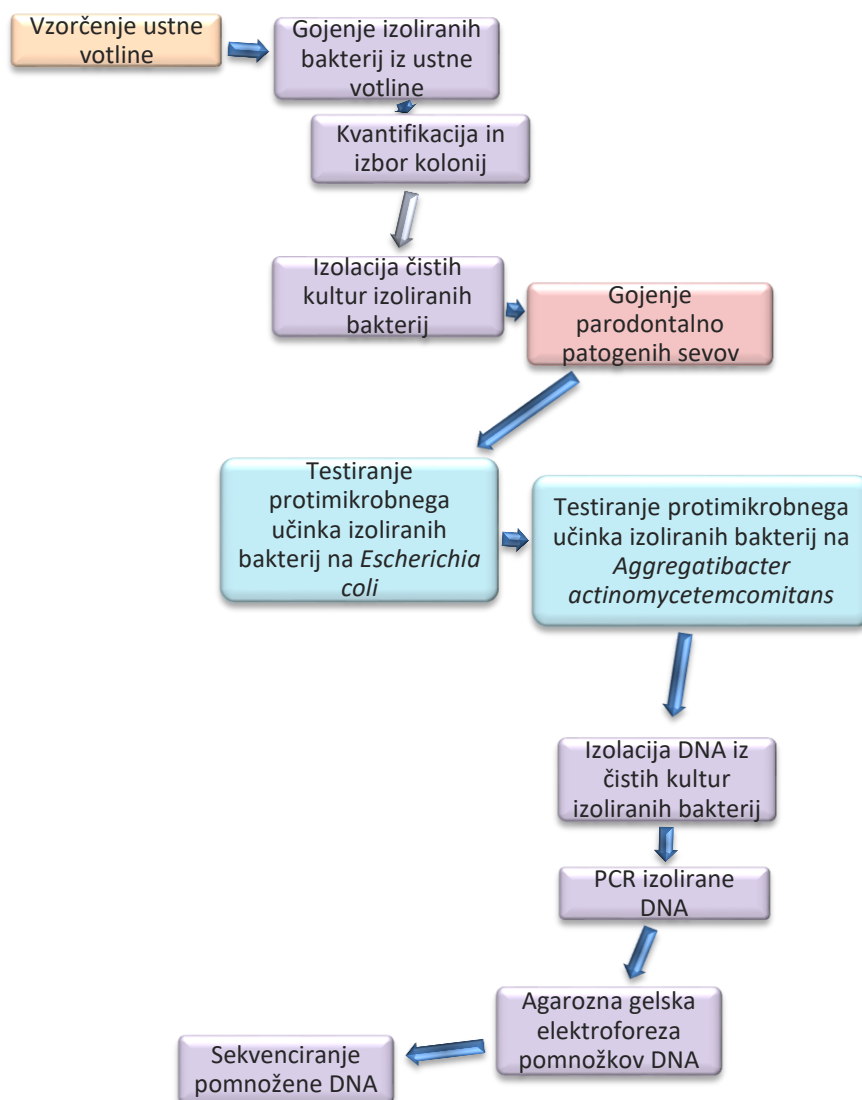
Mleta govedina.....	500 g
dH ₂ O.....	1000 mL
1M NaOH.....	25 mL
Kaziton.....	30 g
Kvasni ekstrakt.....	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Resazurin.....	1 mg
Glukoza.....	4 g
Celobioza.....	1 g
Maltoza.....	1 g
Škrob.....	1 g
Raztopina hemina.....	10 mL
Raztopina vitamina K ₁	0,2 mL

Najprej smo pripravili mesni ekstrakt, tako da smo mleto govedino, vodo in 1M NaOH kuhali 15 min. Vsebino smo nato ohladili na sobno temperaturo, filtrirali in filtratu dodali vodo do končnega volumna 1000 mL. Mešanici smo dodali še preostale sestavine in premešali na magnetnem mešalu, da so se sestavine raztopile. Gojišče smo segrevali do vretja in prepihovali z dušikom 20 min tako, da smo dušik uvajali s plastično cevko, ki je bila priključena na jeklenko z dušikom. Nato smo gojišče ohladili in dodali cistein. pH gojišča smo umerili z NaOH na 7,0. Sledilo je 10 min prepihovanja z dušikom. Kadar smo pripravljali trdno gojišče, smo v medij, ki smo ga predhodno prepihali z dušikom dodali agar. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu (30 min, 121 °C, nadtlaku 1,3 bar). Ko se je gojišče ohladilo, smo mu dodali raztopino hemina in vitamina K₁. Gojišče smo uporabili za gojenje bakterije *P. gingivalis*.

3.5. METODE

3.5.1. Načrt eksperimentalnega dela

V fazi načrtovanja raziskave smo pridobili dovoljenje Komisije RS za medicinsko etiko (številka: 74/04/14) za izvajanje vzorčenja ustne votline prostovoljcev. Nato smo si pred začetkom eksperimentalnega dela pripravili eksperimentalni načrt, ki je prikazan na sliki 2. Eksperimentalno delo smo pričeli z razvojem protokola vzorčenja ustne votline. Sledila je izolacija bakterij iz različnih področij v ustni votlini. V naslednji fazi smo razvili metodo za vrednotenje protimikrobnega učinka izoliranih bakterij na bakterijo *E. coli* in parodontalno patogeno bakterijo *A. actinomycetemcomitans*. Izolirane bakterije s protimikrobnim delovanjem smo nato karakterizirali z molekularnimi mikrobiološkimi metodami.



Slika 2: Shema eksperimentalnega dela.

3.5.2. Vzorčenje ustne votline

Vzorčenje ustne votline je potekalo na 30 zdravih prostovoljcih in so ga izvedli na Stomatološki kliniki, pod vodstvom prof. dr. Milana Petelina, dr. dent. med.

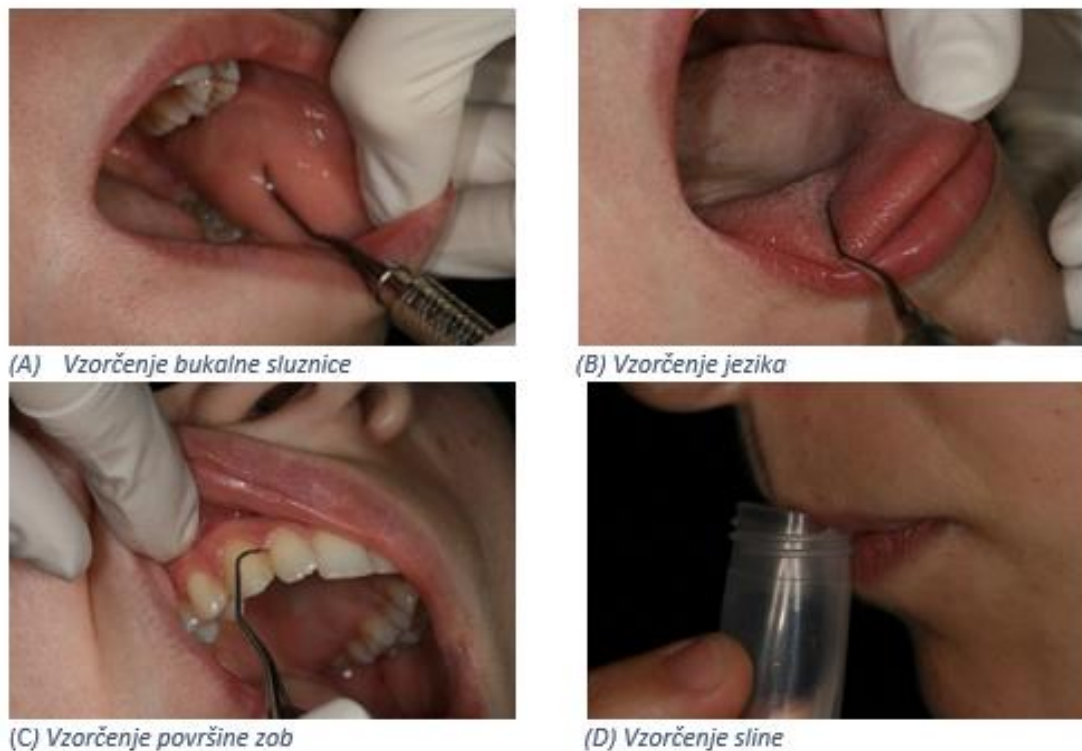
Kriteriji za izbiro prostovoljcev so bili naslednji:

- Zdravi zobje
- Brez kariesa in parodontalne bolezni, vnetja dlesni oz. kakršnih koli nepravilnosti na zobeh
- Minimalno število zalivk (maksimalno 5 zalivk, z izjemo enega prostovoljca, ki jih je imel 14).

Vzorčenje je potekalo ob različnih časovnih točkah:

- Zjutraj (ob 8. uri): Prostovoljci si vsaj 12 ur pred vzorčenjem niso umivali zob ter uživali hrane in pijače.
- Popoldan (ob 14.30 uri): Po jutranjem vzorčenju so lahko prostovoljci uživali hrano in pijačo.
- Na 5 prostovoljcih smo izvedli še vzorčenje z minimalnim vplivom hrane. Izvedli smo samo eno vzorčenje ob 15. uri. Prostovoljci si do vzorčenja niso umili zob in uživali hrane, morali pa so zaužiti velike količine tekočine (1,5 - 2 L vode ali nesladkanega čaja).

Vzorčenje ustne votline smo izvedli na štirih različnih mestih v ustnih votlini: bukalni sluznici, jeziku, zobeh in slini (slika 3). Odvzem vzorcev je potekal tako, da smo s sterilno kireto postrgali določeno površino v ustni votlini (površino jezika, bukalne sluznice ali zob) in kireto pomočili v mikrocentrifugirko v kateri je bil 1 mL sterilne fiziološke raztopine. Sledilo je spiranje vzorca s kireto, tako da smo mikrocentrifugirko skupaj s kireto postavili za 5 s v ultrazvočno kadičko. Vzorce sline smo zbrali tako, da so prostovoljci pljunili v centrifugirko v kateri so bili 3 mL sterilne fiziološke raztopine.



Slika 3: Vzorčenje ustne votline na različnih mestih: (A) vzorčenje bukalne sluznice, (B) jezika in (C) površine zob s sterilno kireto ter (D) vzorčenje sline.

3.5.3. Gojenje in izolacija bakterij iz ustne votline

Za vse vzorce (vzorec bukalne sluznice/jezika/zob/sline) smo pripravili 100-kratno redčitveno vrsto v fiziološki raztopini. Sledilo je razmazovanje vzorcev na različna trdna gojišča: gojišče BHI, gojišče NB, gojišče Emerson in gojišče iz ovsenih kosmičev. Vzorce na gojiščih BHI in NB smo inkubirali do enega tedna aerobno na 30 °C in 37 °C. Vzorce na gojiščih Emerson in gojiščih iz ovsenih kosmičev pa smo inkubirali do enega tedna anaerobno v vrečki, ki smo jo prepihali z dušikom. Plošče z vzorci, ki smo jih odvzeli v prvi časovni točki in pri vzorčenju z minimalnim vplivom hrane, smo inkubirali na 37 °C. Plošče z vzorci, ki pa smo jih odvzeli v drugi časovni točki, smo inkubirali na 30 °C. Sproti smo preverjali rast in morfologijo kolonij. Po inkubaciji smo prešteli kolonije na tistih ploščah, kjer je zrastle številne kolonije (30 – 300 kolonij). Število kolonij je namreč merilo za število kultivabilnih celic v osnovnem vzorcu. Ker pa je lahko izvor posamezne kolonije več kot ena celica, rezultat izražamo kot število CFU (ang. colony-forming units) na mL ali g vzorca. S pomočjo števila kolonij in razreditev osnovnega vzorca smo izračunali koncentracijo živih oz. kultivabilnih celic v osnovnem vzorcu. Sledila je izolacija čistih kultur, tako da smo na plošči z mešano kulturo izbrali kolonijo bakterije, ki smo jo želeli

izolirati v čisti kulturi in jo s cepilno zanko precepili na sveže trdno gojišče. Izbrali smo takšne kolonije, ki so imele določen protimikrobni učinek na ostale bakterije na gojišču (v prisotnosti njih niso rastle ostale kolonije). Izolirane bakterijske seve smo shranili v tekoča gojišča NB z dodatkom 15 % glicerola v zamrzovalnik s temperaturo -20 °C in -80 °C.

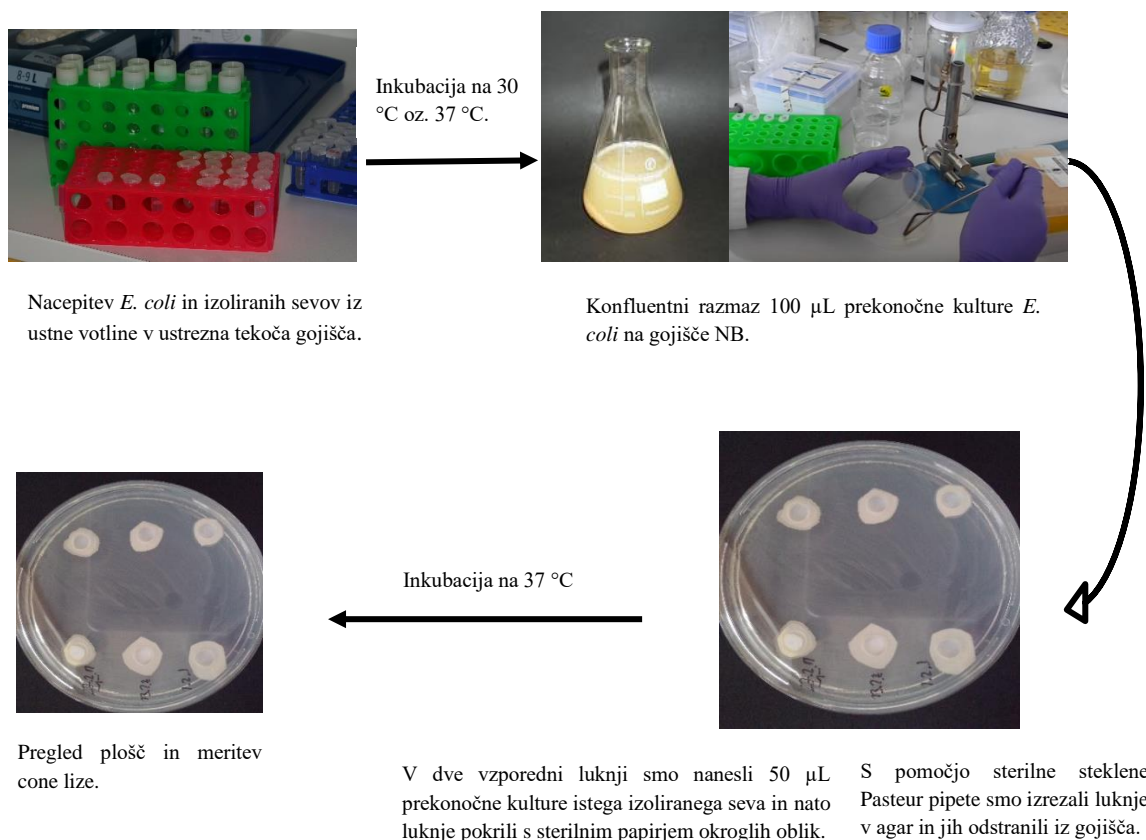
3.5.4. Gojenje izbranih parodontalno patogenih sevov

Izbrali smo dva tipična parodontalno patogena bakterijska seva, to sta *Fusobacterium nucleatum* in *Porphyromonas gingivalis*, ki sta striktna anaeroba. Seva smo nagojili v ustreznih tekočih gojiščih. Bakterijo *Fusobacterium nucleatum* smo nacepili v tekoče gojišče 104.PYG za gojenje anaerobnih mikroorganizmov v stekleničko Schott, ki smo jo postavili v anaerobni lonec in gojili dva dni na 37 °C. Bakterijo *Porphyromonas gingivalis* smo nacepili v mesni medij z ogljikovimi hidrati v stekleničko Schott, ki smo jo postavili v anaerobni lonec in gojili dva dni na 37 °C. Ker smo želeli postaviti karseda enostaven test za preverjanje protimikrobnega učinka, smo skušali izbrati takšne bakterije, ki niso zelo občutljive na prisotnost kisika. Izkazalo se je, da je takšna bakterija *A. actinomycetemcomitans*, ki smo jo kasneje uporabili za izvedbo testa protimikrobne učinkovitosti izoliranih bakterijskih sevov. Bakterijo *A. actinomycetemcomitans* smo nacepili v tekoče gojišče BHI in jo gojili dva dni na 37 °C v mikroaerofilnem okolju (v nepredušno zaprtem loncu s svečko). Ko je bakterija zrastle, smo jo nacepili na trdno gojišče BHI. Vse vzorce parodontalno patogenih sevov smo shranili v ustrezna tekoča gojišča z dodatkom 15 % glicerola in na steklenih kroglicah v zamrzovalnik s temperaturo -80 °C.

3.5.5. Testiranje protimikrobnega učinka izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo *Escherichia coli*

Preden smo izvedli testiranje protimikrobnega učinka na parodontalno patogenem sevu (*A. actinomycetemcomitans*), smo izvedli testiranje izoliranih bakterijskih sevov na sev *E. coli* TOP10 (slika 4). Dan pred izvedbo testa smo nacepili sev *E. coli* in izolirane bakterijske seve iz ustne votline v ustrezna tekoča gojišča in jih inkubirali 24 ur na 37 °C oziroma 30 °C. Tako smo dobili prekonočno kulturo. Test protimikrobnega učinka smo izvedli po naslednjem postopku. Na trdno gojišče NB smo s spatulo po Drigalskem konfluentno razmazali 100 µL prekonočne kulture seva *E. coli*. Nato smo s pomočjo steklene Pasteurjeve pipete, ki smo jo predhodno prežarili v plamenu, izrezali luknje v agar in jih s pomočjo sterilne pincete previdno odstranili iz gojišča. Vsaki izolirani bakterijski sev smo testirali v duplikatih, kar pomeni, da smo v dve vzporedni luknji nanesti 50 µL prekonočne kulture

istega izoliranega bakterijskega seva. Kot negativno kontrolo smo v luknje nanegli le destilirano vodo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili raztopino antibiotika ampicilina (50 µg/mL). Le-ta s časom razpada, zato se njegova koncentracija znižuje in zato lahko po določenem času opazimo ponovno rast bakterij v okolici lukenj napolnjenih z raztopino tega antibiotika. Luknje smo nato pokrili s krogi sterilnega papirja. Plošče smo inkubirali 24 ur na 37 °C. Naslednji dan smo pregledali plošče in izmerili cone lize, če je bila le-ta prisotna.

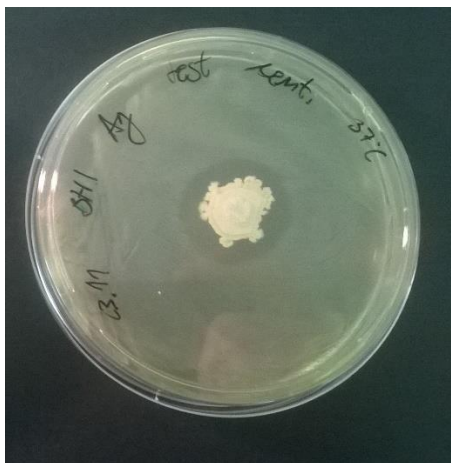


Slika 4: Shema izvedbe testa protimikrobnega delovanja izoliranih bakterijskih sevov iz ustne votline na *E. coli*.

3.5.6. Testiranje protimikrobnega učinka izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Dan pred izvedbo testa smo nacepili sev *A. actinomycetemcomitans* in izolirane bakterijske seve iz ustne votline v ustrezna tekoča gojišča in jih inkubirali 24 ur na 37 °C oziroma 30 °C. Naslednji dan smo prekončno kulturo *A. actinomycetemcomitans* centrifugirali 15 min pri 10.000 g s stopnjo pospeševanja 15 s in stopnjo ustavljanja 15 s, z razlogom, da se nam sediment ni odlepil in dispergiral v supernatantu. Prekončne kulture izoliranih sevov pa smo centrifugirali 10 min pri 10.000 g in 23 °C. Test protimikrobnega učinka smo izvedli

tako, da smo na trdno gojišče BHI s spatulo po Drigalsem konfluentno razmazali 100 μ L centrifugiranega seva *A. actinomycetemcomitans*. Nato smo s pomočjo steklene Pasteurjeve pipete, ki smo jo predhodno prežarili, izrezali luknje v agar in jih s pomočjo sterilne pincete previdno odstranili iz gojišča. V posamezno luknjo smo nanegli 30 μ L supernatanta kulture izoliranega bakterijskega seva. Kot negativno kontrolo smo v luknje nanegli destilirano vodo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili raztopino antibiotika doksiciklina (10 μ g/mL), ki ima protimikrobni učinek na to bakterijo. Luknje smo nato pokrili s krogi sterilnega papirja. Plošče smo inkubirali 72 ur na 37 °C. Po 24 urah smo pregledali plošče in izmerili cono lize, če je bila le-ta prisotna. Po 72 urah smo ponovno pregledali plošče in izmerili cono lize (slika 5). Testirali smo tiste seve, ki so imeli viden učinek na *E. coli* (opazna cona lize).



Slika 5: Primer izvedbe testa protimikrobne učinkovitosti na *A. actinomycetemcomitans* (v okolici testiranega bakterijskega seva iz ustne votline je jasno vidna cona lize).

3.5.7. Izolacija DNA izoliranih bakterijskih sevov iz čistih kultur

Izolacijo bakterijske DNA smo izvedli na tistih izoliranih bakterijskih sevih pri katerih smo dokazali protimikrobni učinek (test na bakterijo *E. coli*). Za izolacijo DNA smo uporabili reagent Chelex. Chelex je tržno ime za polistiren-divinilbenzen-iminodiacetat, ki je kelator kovinskih ionov in se uporablja za čiščenje spojin preko ionske izmenjave. Pri izolaciji DNA veže pozitivno nabite celične sestavine, hkrati pa nase veže dvovalentne kovinske ione, ki so kofaktorji nukleaz. Prednost te metode pred klasično izolacijo DNA je hiter in enostaven postopek izolacije ter manjša možnost navzkrižne kontaminacije tekom izvedbe postopka. Metoda daje enovijačno DNA, ki jo lahko uporabimo za pomnoževanje. Najprej smo pripravili 5 % suspenzijo Chelex praška v sterilni miliQ vodi. V posamezno mikrocentrifugirko smo nato odpipetirali 100 μ L suspenzije Chelex. S cepilno zanko smo

nato postrgali 1 kolonijo izbranega seva in jo suspendirali v suspenziji Chelex. Če v Chelex suspenzijo dodamo preveč vzorca, lahko nastopi inhibicija PCR. Nato smo mikrocentrifugirke segrevali 15 min na 100 °C. Sledilo je 10 min centrifugiranja pri 4 °C in 3000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali supernatant (tekočo fazo) v nove mikrocentrifugirke in vzorce DNA shranili na 4 °C.

3.5.8. PCR analiza izolirane DNA

Izvedli smo PCR analizo izolirane DNA. Reakcija PCR je občutljiva na kontaminacijo s tujo DNA, zato smo PCR mešanico pripravljali v komori z UV-lučjo. Najprej smo komoro in ves delovni pribor očistili s 70 % alkoholom in vklopili UV-luč za 30 min, da smo zagotovili čisto okolje. V tem času smo odtalili reagente ter pripravili vzorce DNA. PCR reakcijo smo delali s 36 vzorci in negativno kontrolo. Zaradi izgub, ki nastanejo pri pipetiranju, smo dodali 10 % pribitek reagentov. Delali smo po naslednjem protokolu. Najprej smo pripravili PCR mešanico za 37 vzorcev. V 2 mL mikrocentrifugirko smo najprej odpipetirali ustrezen volumen MiliQ vode, nato smo dodali MgCl₂, pufer Taq, oligonukleotidna začetnika 27F in 1492R, dNTP-je in na koncu Taq polimerazo. S polavtomatskimi pipetami smo odpipetirali ustrezne volumne PCR mešanice v 0,2 mL mikrocentrifugirke. Nato smo s polavtomatsko pipeto dodali še vzorec DNA. Mikrocentrifugirke smo vstavili v aparat Biometra in zagnali program 01 bac 27 1495.

PCR mešanica za en vzorec je bila sestavljena iz:

Taq polimeraza (5 U/μL)	0,275 μL
10X pufer Taq	5,0 μL
dNTP (10 mM)	1,0 μL
Oligonukleotidni začetnik 27F (10 μM)	1,0 μL
Oligonukleotidni začetnik 1492R (10 μM)	1,0 μL
MgCl ₂ (25 mM)	3,0 μL
MiliQ voda	36,625 μL

PCR program, ki smo ga uporabili, je prikazan v preglednici II.

Preglednica II: Potek PCR programa.

CIKEL	TEMPERATURA	ČAS	ŠTEVILO CIKLOV
Začetna denaturacija	95 °C	3 min	1
Denaturacija	95 °C	45 s	35
Prileganje	54 °C	45 s	
Podaljševanje	72 °C	2 min	
Končno podaljševanje	72 °C	10 min	1
Hlajenje	4 °C	/	/

3.5.9. Agarozna gelska elektroforeza pomnožene DNA

Po koncu PCR reakcije smo preverili uspešnost pomnoževanja vzorcev DNA z agarozno gelsko elektroforezo. Gelska elektroforeza temelji na ločevanju molekul DNA glede na njihovo velikost. Le-te potujejo v električnem polju skozi agarozni gel. Za elektroforezo smo uporabili 1 % agarozni gel in 0,5X pufer TAE. S pomočjo merilnega valja smo odmerili 50 mL 0,5X pufra TAE in mu dodali 0,5 g agaroze. Nato smo raztopino agaroze in pufra segrevali dokler se raztopina ni popolnoma zbistrila. Ko se je raztopina rahlo ohladila, smo jo vlili v pripravljen modelček za gel z glavničkom. Ko se je gel strdil (po cca. 45 min), smo previdno odstranili glavniček. Gel smo prestavili v elektroforezno kadičko in ga prelili z 0,5X TAE pufrom. Sledila je priprava vzorcev za nanos na gel. V mikrotiterski plošči smo v vdolbinici zmešali 1 μ L 6 \times Loading Dye in 1 μ L 2 \times Sybr green I-a s 5 μ L PCR produkta. Nanesli smo tudi negativno kontrolo (1 μ L 6 \times Loading Dye in 1 μ L 2 \times Sybr green I-a) in merilo Lambda DNA/Pst. s pipeto smo nato previdno nanesli vzorce v jamice gela. Ko smo končali z nanosom smo elektroforezno kadičko pokrili s pokrovom in nastavili napetost na 100 V za cca. 25 min. Gel smo nato pregledali pod UV transiluminatorjem (Biometra).

3.5.10. Analiza rezultatov sekvenciranja

Vzorci pomnožene DNA so se poslali na sekvenciranje (Macrogen, Nizozemska). Dobljene sekvence smo vnesli v RDPII bazo podatkov in primerjali s 16S rRNA zaporedji iz baze podatkov. Najprej smo nukleotidna zaporedja poravnali z algoritmom ClustalW. Nato smo izrisali Neighbor - joining filogenetsko drevo. Uporabili smo metodo vezanja (angl. Bootstrap) s 500 ponovitvami in model Kimura 2-parameter. Tako smo določili rod in vrsto posameznih sevov.

3.5.11. Statistične metode

V raziskavi so prostovoljci izpolnili kratek vprašalnik (Priloga II). Glede na njihove odgovore smo se odločili pogledati ali obstaja kakšna povezava med določenimi karakteristikami prostovoljcev in številom izoliranih sevov s protimikrobnim učinkom in njihovim premerom cone lize na *A. actinomycetemcomitans*. Za izračune korelacij smo uporabili program SPSS. Grafe smo izrisali v programu Excel.

4. REZULTATI

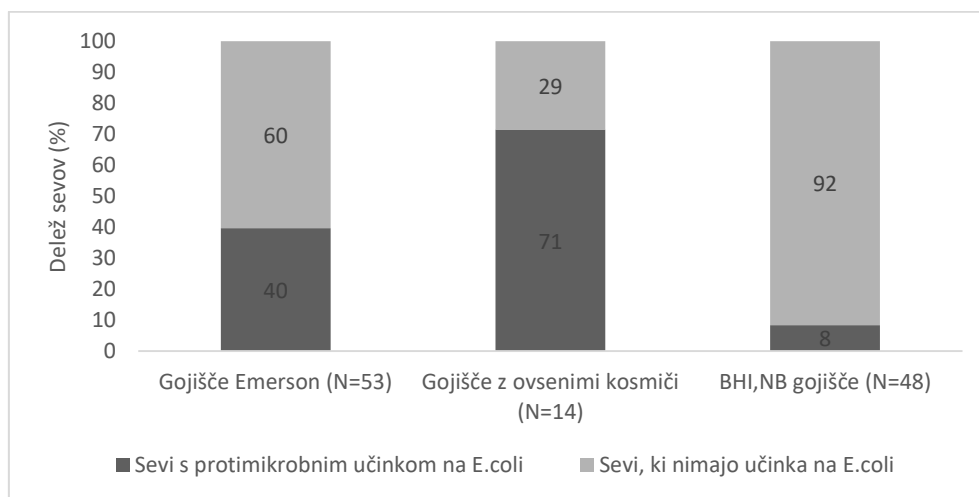
4.4. Izolirani bakterijski sevi iz ustne votline

V prilogi I so v preglednici VI zbrani vsi bakterijski sevi, ki smo jih izolirali iz ustne votline. Skupno smo izolirali 373 bakterijskih sevov iz ustne votline 30 prostovoljcev. Od tega smo 136 sevov izolirali na gojišču BHI, 125 sevov na gojišču NB, 98 sevov na gojišču Emerson in 14 sevov na gojišču iz ovsenih kosmičev. Izolirali smo po morfologiji različne bakterije (okroglih, nepravilnih oblik, različnih barv itd.). Bakterijske kolonije na gojišču Emerson so si bile med seboj dokaj morfološko podobne, medtem ko so bile na preostalih gojiščih morfološko bolj različne.

4.5. Testiranje protimikrobnega učinka izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo *Escherichia coli*

Najprej smo testirali protimikrobni učinek izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo *E. coli*. Test smo izvedli na celokupno 53 bakterijskih sevov izoliranih iz gojišča Emerson, 14 bakterijskih sevov izoliranih iz gojišča z ovsenimi kosmiči in 48 bakterijskih sevov izoliranih iz gojišč NB in BHI.

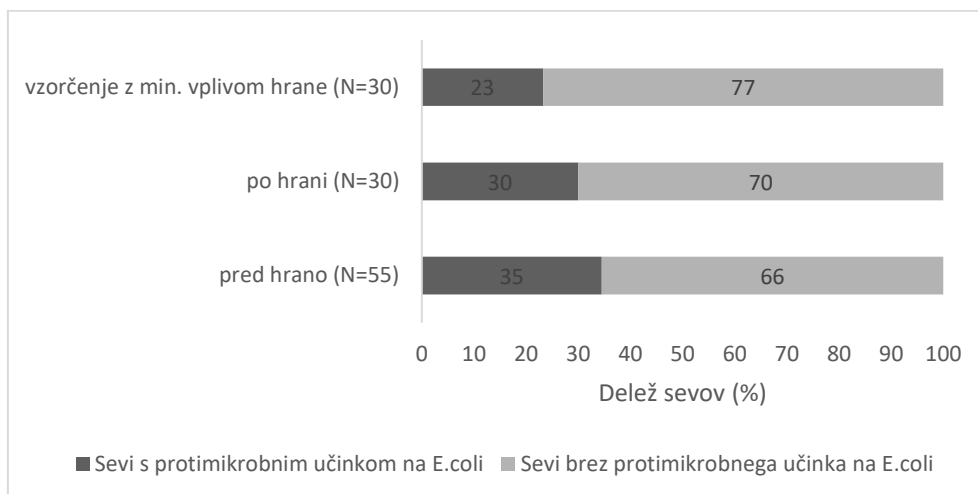
Največ sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* smo izolirali iz gojišča z ovsenimi kosmiči in gojišča Emerson. Zelo majhen delež sevov izoliranih iz gojišč NB in BHI je imel protimikrobni učinek na *E. coli* (slika 6).



Slika 6: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* glede na celokupno število testiranih sevov.

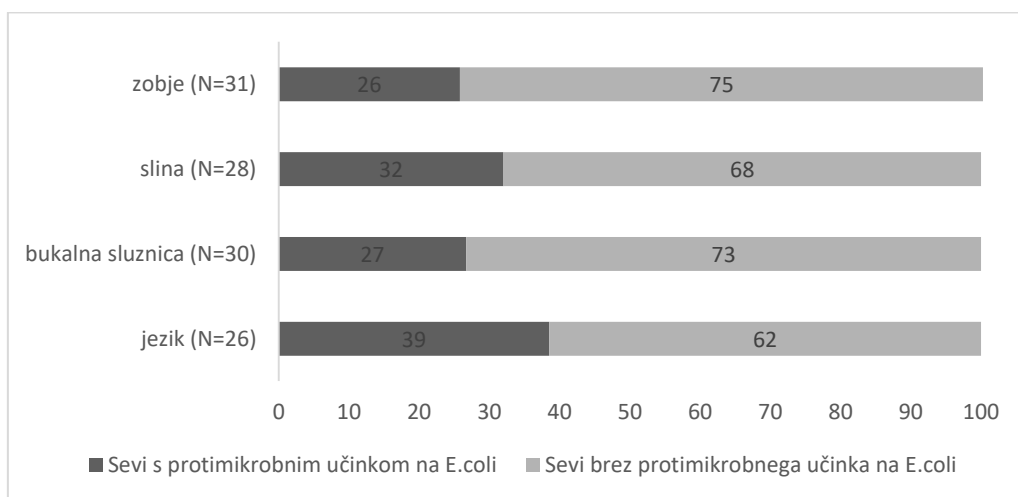
Nadalje smo se odločili raziskati vpliv časa vzorčenja in vpliv mesta vzorčenja v ustni votlini na pojavnost sevov s protimikrobnim učinkom.

Delež sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* je večji pri jutranjem vzorčenju kot pri popoldanskem vzorčenju (slika 7).



Slika 7: Vpliv časa vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli*.

Če primerjamo delež sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* in sevov, ki takega učinka nimajo, vidimo, da je imelo protimikrobni učinek največ sevov izoliranih s površine jezika (slika 8).

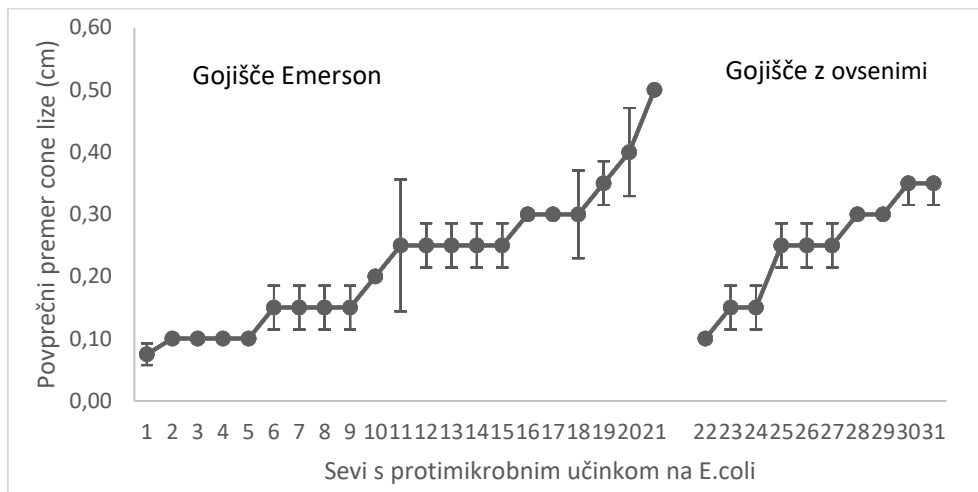


Slika 8: Vpliv mesta vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli*.

Skupni povprečni premer cone lize na *E. coli* sevov izoliranih iz gojišča Emerson je bil 0,22 cm s standardnim odklonom 0,11 cm. Skupni povprečni premer cone lize sevov izoliranih iz gojišča z ovsenimi kosmiči je bil 0,25 cm s standardnim odklonom 0,09 cm (preglednica III, slika 9).

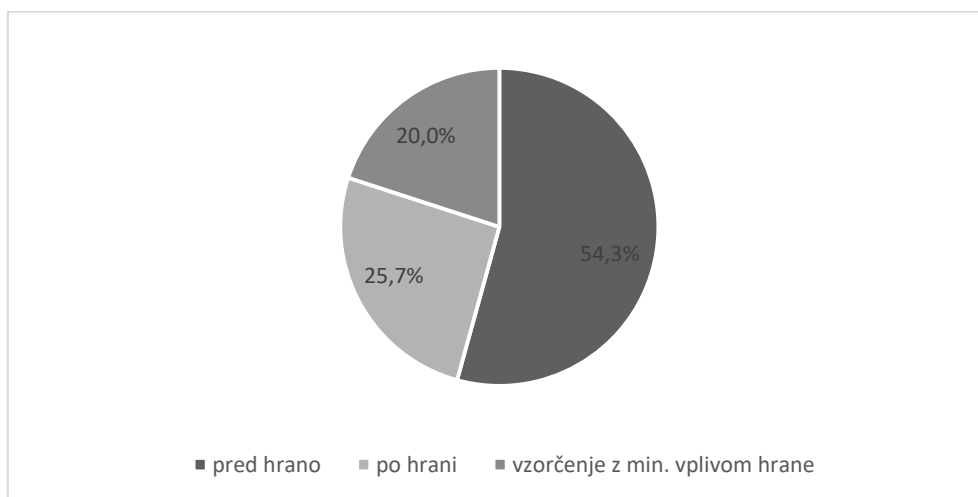
Preglednica III: Premeri cone lize (cm) sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* izoliranih iz različnih gojišč.

Zaporedna številka seva	Uporabljeno gojišče za izolacijo	Sevi s protim. učinkom na <i>E.coli</i>	Premer cone lize 1 (cm)	Premer cone lize 2 (cm)	Povprečni premer cone lize (cm)
1	Emerson	13.1.M	0,1	0,05	0,08
2	Emerson	12.1.Z -1-	0,1	0,1	0,1
3	Emerson	12.1.Z -2-	0,1	0,1	0,1
4	Emerson	30.1.Z -1-	0,1	0,1	0,1
5	Emerson	4.1.Z	0,1	0,1	0,1
6	Emerson	27.1.M -2-	0,2	0,1	0,15
7	Emerson	27.3.M	0,1	0,2	0,15
8	Emerson	28.1.J -1-	0,2	0,1	0,15
9	Emerson	30.1.M	0,1	0,2	0,15
10	Emerson	27.3.Z	0,2	0,2	0,2
11	Emerson	22.1.M	0,1	0,4	0,25
12	Emerson	25.1.S	0,2	0,3	0,25
13	Emerson	27.3.S	0,2	0,3	0,25
14	Emerson	28.1.J -2-	0,2	0,3	0,25
15	Emerson	30.1.Z -2-	0,3	0,2	0,25
16	Emerson	25.3.J	0,3	0,3	0,3
17	Emerson	28.1.M	0,4	0,2	0,3
18	Emerson	28.1.Z	0,3	0,3	0,3
19	Emerson	28.2.J -1-	0,3	0,4	0,35
20	Emerson	25.1.M	0,3	0,5	0,4
21	Emerson	25.2.M	0,5	0,5	0,5
22	Gojišče z ovsenimi kosmiči	27.3.S	0,1	0,1	0,1
23	Gojišče z ovsenimi kosmiči	16.2.S	0,1	0,2	0,15
24	Gojišče z ovsenimi kosmiči	18.1.S -1-	0,1	0,2	0,15
25	Gojišče z ovsenimi kosmiči	11.2.J -2-	0,2	0,3	0,25
26	Gojišče z ovsenimi kosmiči	29.1.S	0,2	0,3	0,25
27	Gojišče z ovsenimi kosmiči	3.2.J -2-	0,2	0,3	0,25
28	Gojišče z ovsenimi kosmiči	21.2.S	0,3	0,3	0,3
29	Gojišče z ovsenimi kosmiči	3.2.J -1-	0,3	0,3	0,3
30	Gojišče z ovsenimi kosmiči	11.2.J -1-	0,3	0,4	0,35
31	Gojišče z ovsenimi kosmiči	3.2.J -2-*	0,3	0,4	0,35

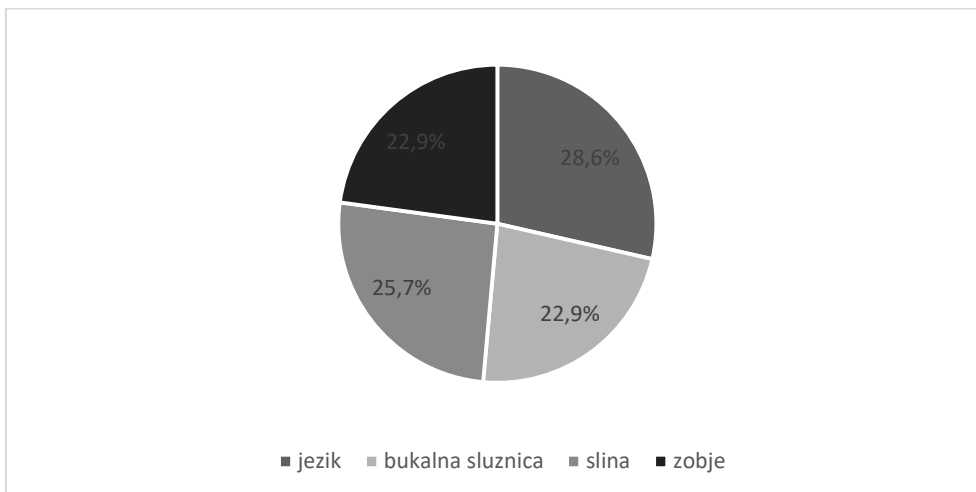


Slika 9: Povprečni premeri cone lize (cm) sevov izoliranih iz gojišča Emerson in gojišča z ovsenimi kosmiči na *E. coli* in prikaz SD-jev (dve ponovitvi).

Izmed 115 testiranih sevov na *E. coli*, jih je imelo 35 protimikrobni učinek (30,4 % sevov). 28,6 % sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* smo izolirali z jezika. 25,7 % sevov smo izolirali iz sline, 22,9 % z zob in 22,9 % z bukalne sluznice. 54,3 % sevov, ki so kazali protimikrobni učinek na *E. coli* smo izolirali z jutranjim vzorčenjem, 25,7 sevov s popoldanskim vzorčenjem in 20,0 % z vzorčenjem z minimalnim vplivom hrane (slika 10,11).



Slika 10: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* glede na čas vzorčenja.

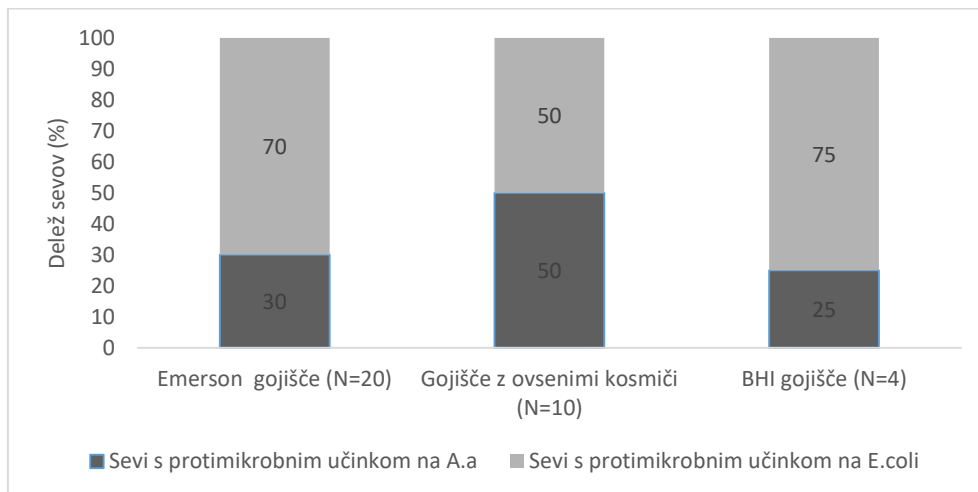


Slika 11: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* glede na mesto vzorčenja.

4.6. Testiranje protimikrobnega učinka izoliranih bakterijskih sevov na bakterijo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

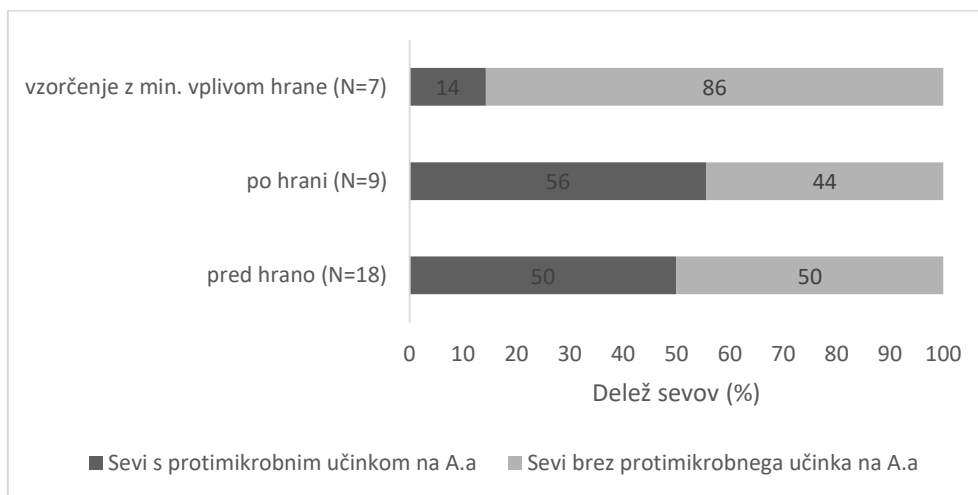
Po testiranju protimikrobnega učinka izoliranih sevov na *E. coli* smo izvedli še testiranje na bakterijo *A. actinomycetemcomitans*. Testirali smo tiste seve, ki so imeli viden učinek (cono lize) na *E. coli*. Testirali smo 20 sevov izoliranih iz gojišča Emerson, 10 sevov izoliranih iz gojišča z ovsenimi kosmiči in 4 seve izolirane iz gojišča BHI.

Izmed 20 testiranih sevov izoliranih iz gojišča Emerson, ki so imeli protimikrobni učinek na *E. coli*, je imelo 30 % sevov protimikrobni učinek tudi na *A. actinomycetemcomitans*. Izmed 10 testiranih sevov izoliranih iz gojišča z ovsenimi kosmiči je imelo 50 % sevov protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans*. Izmed 4 testiranih sevov izoliranih iz gojišča BHI je imelo 25 % sevov protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans* (slika 12).

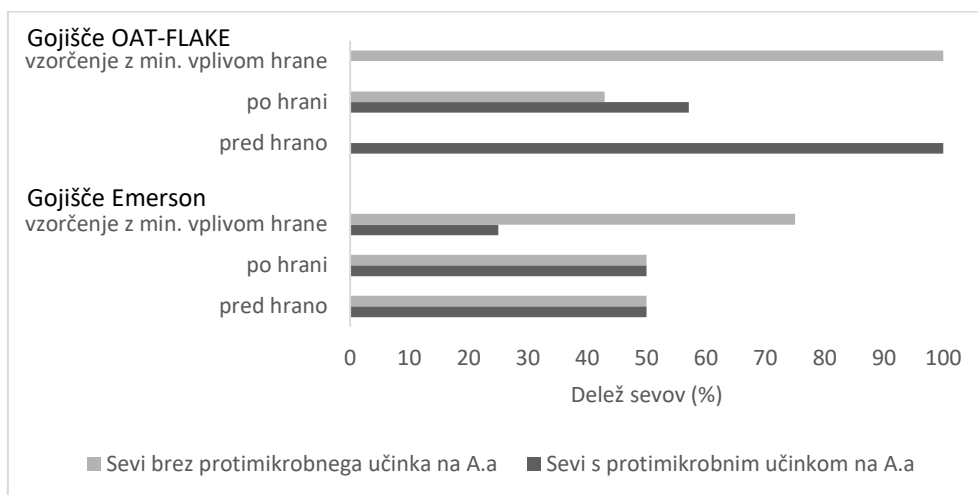


Slika 12: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* glede na seve s protimikrobnim učinkom na *E. coli*.

Če primerjamo delež sevov s protimikrobnim učinkom in sevov, ki takega učinka nimajo, vidimo, da je delež sevov s protimikrobnim učinkom večji pri popoldanskem vzorčenju (slika 13). Sevi, ki smo jih izolirali v drugi časovni točki (po hrani) kažejo večji protimikrobni učinek na gojišču z ovsenimi kosmiči. Sevi, ki so bili izolirani v prvi časovni točki (pred hrano) iz obeh gojišč, so imeli izrazit protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans* (slika 14).

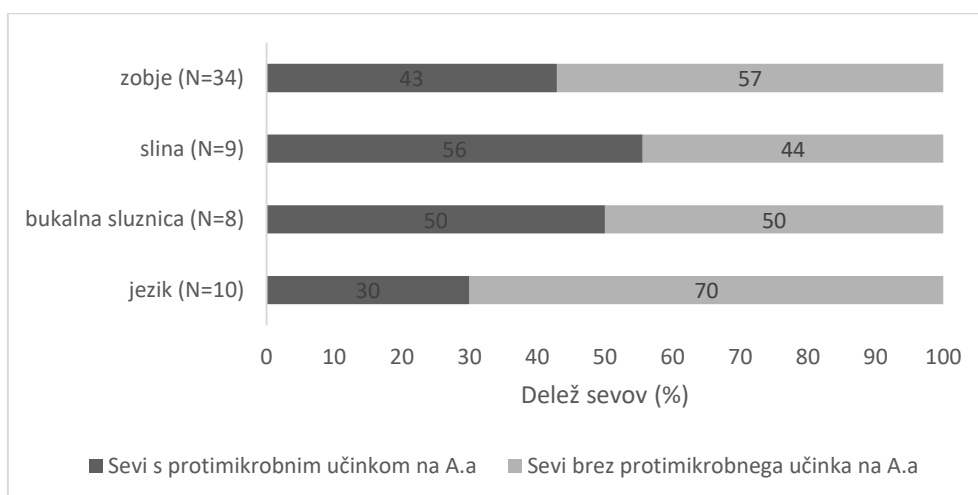


Slika 13: Vpliv časa vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans*.

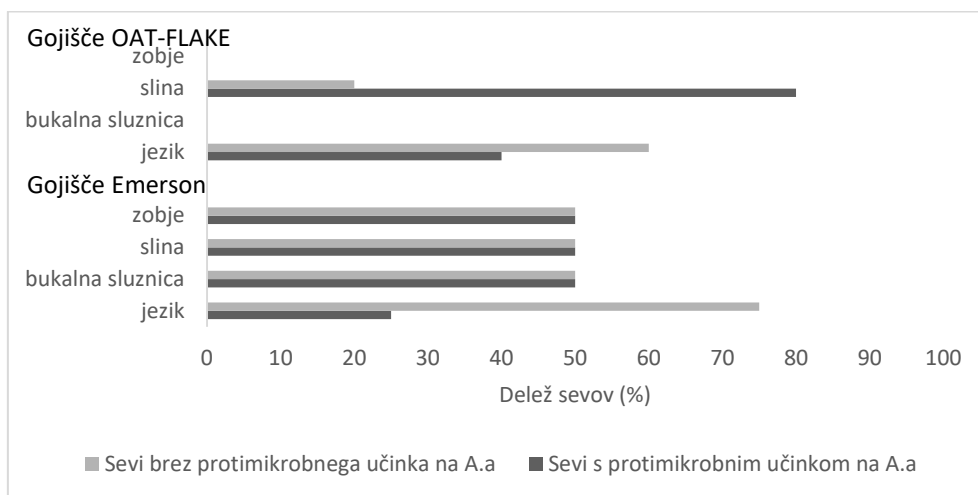


Slika 14: Vpliv časa vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans*.

Če primerjamo delež sevov s protimikrobnim učinkom in sevov, ki takega učinka nimajo, vidimo, da je imelo protimikrobni učinek največ sevov, ki smo jih izolirali iz slina in bukalne sluznice (slika 15). Sevi izolirani z vseh proučevanih mest v ustni votlini, ki smo jih gojili na gojišču Emerson, kažejo protimikrobni učinek. Sevi, ki smo jih izolirali iz vzorcev slina in jezika in smo jih gojili na gojišču z ovsenimi kosmiči, kažejo protimikrobni učinek, pri čemer imajo največji protimikrobni učinek vzorci izolirani iz slina. Do teh razlik je prišlo, ker na tem gojišču nismo izolirali nobenega seva z bukalne sluznice. En sev smo izolirali iz površine zob, vendar le-ta ni kazal učinka na *E. coli* (slika 16).

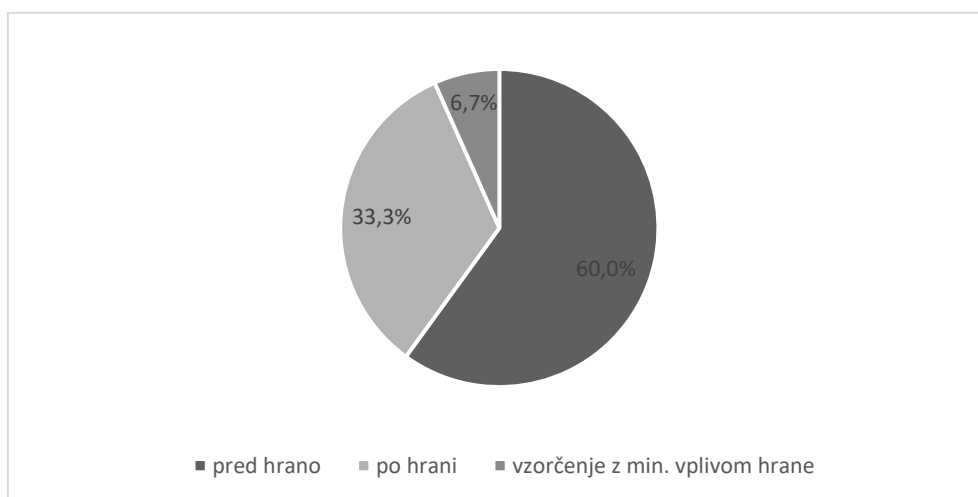


Slika 15: Vpliv mesta vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans*.

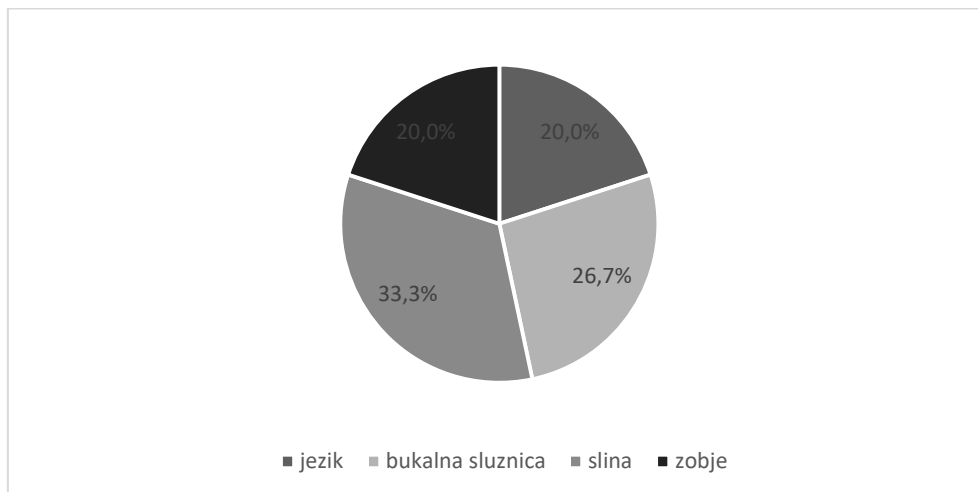


Slika 16: Vpliv mesta vzorčenja na delež sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* izoliranih iz gojišča Emerson in gojišča z ovsenimi kosmiči.

Izmed 34 sevov s protimikrobnim učinkom na *E. coli* jih je imelo 15 protimikrobnih učinkov tudi na *A. actinomycetemcomitans* (44,1 % sevov). 33,3 % sevov, ki so imeli protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans*, smo izolirali iz sline. 26,7 % sevov smo izolirali z bukalne sluznice, 20,0 % z zob in 20,0 % z jezika. 60,0 % sevov, ki so imeli protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans* smo izolirali z jutranjim vzorčenjem, 33,3 % s popoldanskim vzorčenjem in 6,7 % z vzorčenjem z minimalnim vplivom hrane (sliki 17 in 18).



Slika 17: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* glede na čas vzorčenja.

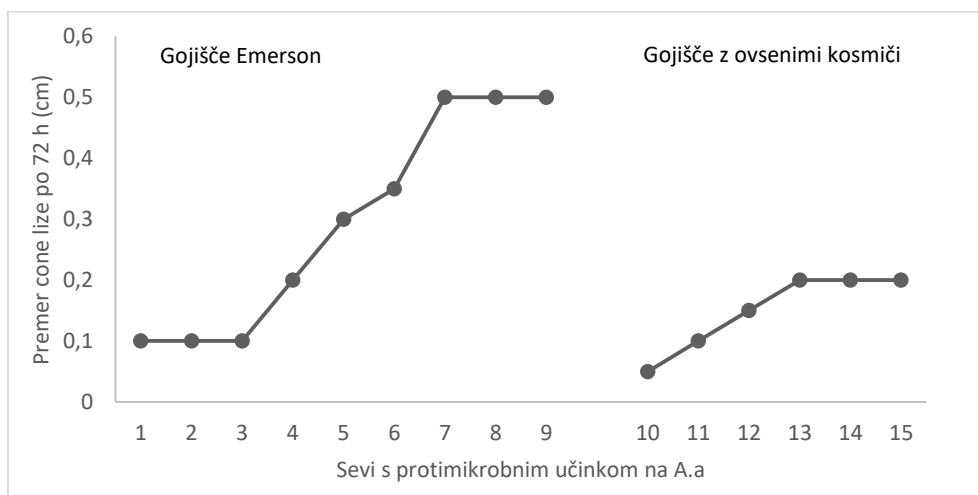


Slika 18: Delež sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* glede na mesto vzorčenja.

Povprečni premer cone lize na *A. actinomycetemcomitans* sevov, ki smo jih izolirali iz gojišča Emerson po 72 urah, je bil 0,29 cm s standardnim odklonom 0,18 cm. Povprečni premer cone lize na *A. actinomycetemcomitans* sevov, ki smo jih izolirali iz gojišča z ovsenimi kosmiči po 72 urah, pa je 0,15 cm s standardnim odklonom 0,06 cm (preglednica IV, slika 19).

Preglednica IV: Premeri cone lize (cm) sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* izoliranih iz različnih gojišč.

Zaporedna številka seva	Sevi s protimikrobnim učinkom na <i>A.a</i>	Uporabljeno gojišče za izolacijo	Premer cone lize po 24 h (cm)	Premer cone lize po 72 h (cm)
1	12.1.Z -1-	Emerson	0,1	0,1
2	25.1.S	Emerson	0,1	0,1
3	28.1.J -2-	Emerson	0,1	0,1
4	22.1.M	Emerson	0	0,2
5	13.1.M	Emerson	0,1	0,3
6	30.1.M	Emerson	0	0,35
7	12.1.Z -2-	Emerson	0	0,5
8	27.3.Z	Emerson	0,1	0,5
9	25.2.M	Emerson	0,25	0,5
10	11.2.J -1-	Gojišče z ovsenimi kosmiči	0,04	0,05
11	18.1.S -1-	Gojišče z ovsenimi kosmiči	0,1	0,1
12	21.2.S	Gojišče z ovsenimi kosmiči	0,15	0,15
13	29.1.S	Gojišče z ovsenimi kosmiči	0,15	0,2
14	3.2. J -2-*	Gojišče z ovsenimi kosmiči	0,15	0,2
15	16.2.S	Gojišče z ovsenimi kosmiči	0	0,2



Slika 19: Premeri cone lize sevov izoliranih iz gojišča Emerson in iz gojišča z ovsenimi kosmiči na *A. actinomycetemcomitans* po 72 h.

Ker smo želeli ugotoviti, ali število zalivk v ustni votlini vpliva na pojavnost sevov s protimikrobnim učinkom, smo preverili, ali obstaja korelacija med omenjenima spremenljivkama. Spearmanov koeficient korelacije je negativen in znaša $-0,329$, kar pomeni da s povečevanjem števila zalivk na zobeh se število sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* zmanjšuje. Vendar je stopnja značilnosti (α) $0,213$, kar pomeni, da je korelacija statistično neznačilna.

Zanimalo nas je tudi, ali obstajajo razlike med povprečnim premerom cone lize na *A. actinomycetemcomitans* in številom zalivk. Ker je bila naša odvisna spremenljivka normalno porazdeljena, smo naredili t-test. Iz t-testa je razvidno, da je stopnja značilnosti pri Levenovem testu $0,977$, kar je več kot $0,05$. To pomeni, da Levenov test ni statistično značilen in lahko sprejmemo sklep o enakosti varianc (ang. equal variances assumed). Vrednost t-testa znaša $-1,047$, medtem ko stopnja značilnosti znaša $0,313$. Ker vrednost stopnje značilnosti presega $0,05$, lahko trdimo, da se povprečni premer cone lize med osebami z < 1 zalivko in osebami z > 1 zalivko ne razlikuje.

Dodatno smo preverili, ali obstaja korelacija med številom zalivk in povprečnim premerom cone lize na bakterijo *A. actinomycetemcomitans*. Pearsonov koeficient je negativen in znaša $-0,353$, kar pomeni, da s povečevanjem števila zalivk na zobeh se velikost cone lize na bakterijo *A. actinomycetemcomitans* zmanjšuje. Vendar je stopnja značilnosti (α) $0,180$, kar pomeni, da je korelacija statistično neznačilna. Z 18 % tveganjem lahko trdimo, da obstaja

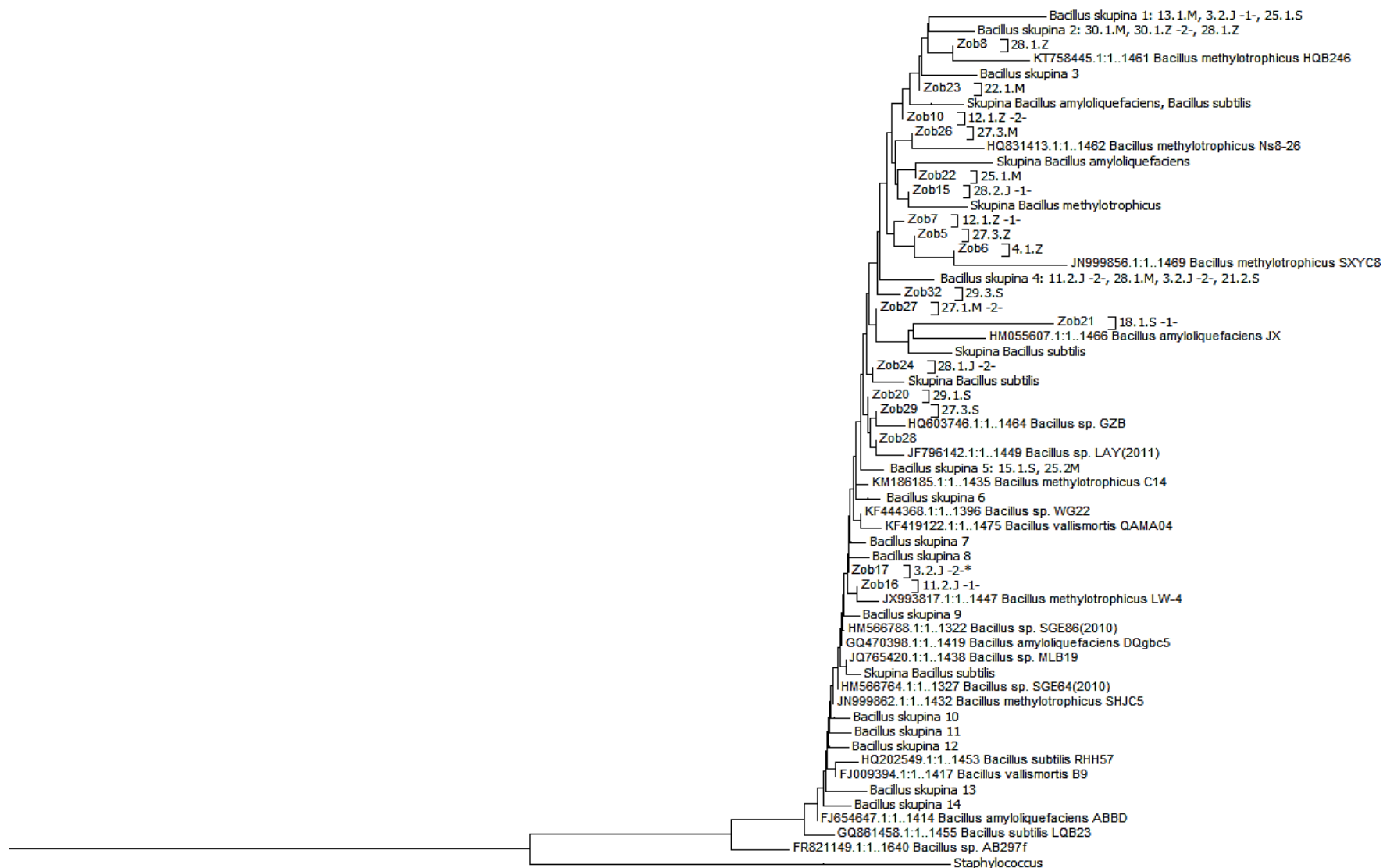
korelacija med številom zalivk in povprečnim premerom cone lize na bakterijo *A. actinomycetemcomitans*.

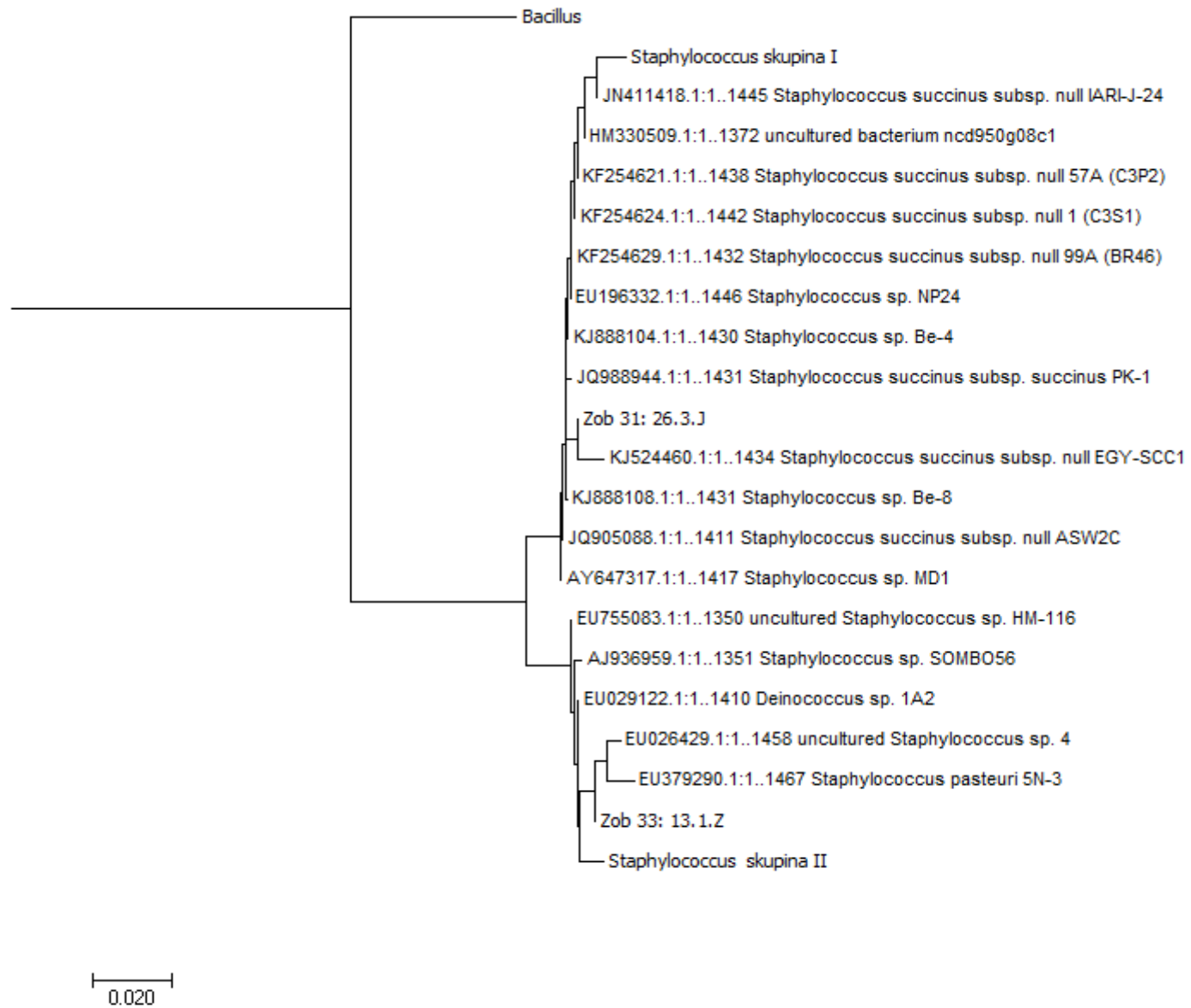
Prostovoljci so izpolnili vprašalnik, ki je zajemal različna vprašanja (priloga II). Odločili smo se podrobneje pogledati značilnosti prostovoljcev, pri katerih smo izolirali seve s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans*. Izmed 30 prostovoljcev, smo pri 13 prostovoljcih izolirali seve s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans*. Preučili smo njihove prehranske navade in ustno higieno. Ugotovili smo, da jih 84,6 % uživa mešano hrano in 15,4 % samo rastlinsko hrano. Polovica prostovoljcev uživa mlečne in fermentirane mlečne izdelke. 53,8 % prostovoljcev si ščetka zobe 2 × na dan, 38,5 % prostovoljcev 2-3 × na dan in 7,7 % prostovoljcev samo 1 × na dan. Večina prostovoljcev je odgovorila, da si vsak dan redno nitka zobe (kar 69,2 %). Večina prostovoljcev uporablja različne fluorirane zobne paste (53,8 %), 38,5 % prostovoljcev pa uporablja zobno pasto Sensodyne. 92,3 % prostovoljcev je odgovorilo, da neprijetnega zadaha iz ust nimajo. 23 % prostovoljcev je odgovorilo, da spijo z odprtimi usti. Želeli smo tudi izvedeti, ali žvečijo žvečilne gumije; pri čemer jih je 38,5 % odgovorilo pritrdilno. 69,2 % prostovoljcev izvaja aerobno obliko telovadbe, 23 % prostovoljcev izvaja aerobno in anaerobno obliko telovadbe, 7,7 % prostovoljcev pa ne telovadi. 46,2 % prostovoljcev je odgovorilo, da imajo njihovi družinski člani zdrave zobe (majhno število zalivk itd.), 30,8 % prostovoljcev, da njihovi družinski člani nimajo zdravih zob, in 23,1 % prostovoljcev, da ne vedo kakšno stanje zob imajo njihovi družinski člani. Zanimalo nas je tudi, ali so pred kratkim jemali antibiotik. Vsi so odgovorili, da antibiotika že dlje časa niso jemali (več kot 1 leto). Preverili smo ali katera izmed značilnosti prostovoljcev korelira s pojavnostjo sevov s protimikrobnim učinkom, pri čemer korelacije ni bilo opaziti.

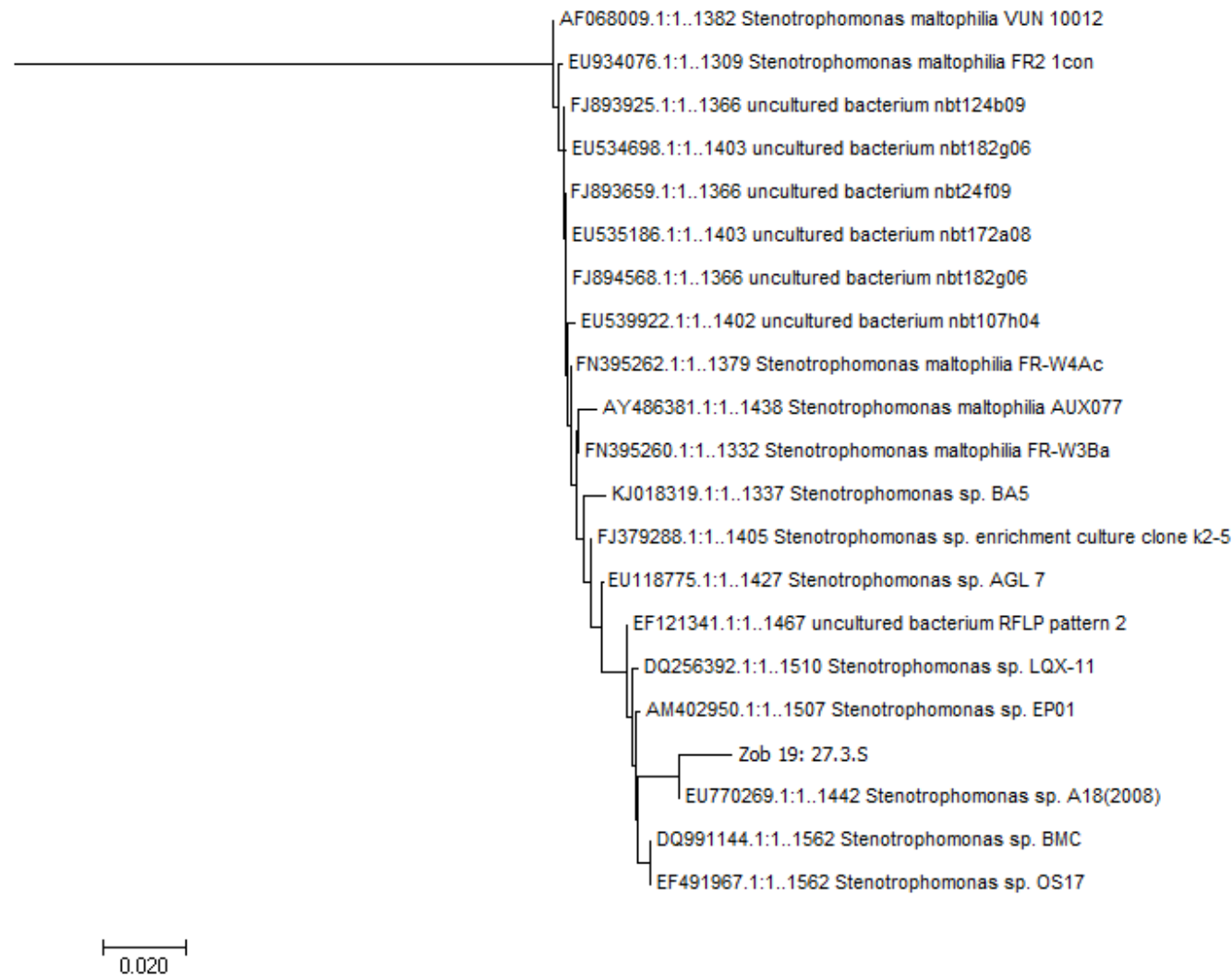
4.7. Analiza rezultatov sekvenciranja

Rezultati izrisa filogenetskega drevesa (slika 20) so pokazali, da izmed 32 sevov, ki imajo protimikrobni učinek, jih 29 pripada deblu Firmicutes, razredu Bacili, redu Bacillales, družini Bacillaceae in rodu *Bacillus* in vrste: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* in *Bacillus methylotrophicus*.

Dva testirana seva sodita v deblo Firmicutes in razred Bacili, rod *Staphylococcus* in vrsti *Staphylococcus pasteurii* in *Staphylococcus succinus*. En testiran sev sodi v deblo Proteobacteria, razred Gamaproteobacteria, red Xanthomonadales in rod *Stenotrophomonas*.







Slika 20: Filogenetska drevesa izoliranih bakterijskih sevov izrisana v programu MEGA.

5. DISKUSIJA

Večina raziskav o probiotičnem delovanju mikroorganizmov v ustni votlini je bila do danes izvedena na podlagi preučevanja avtohtonih laktobacilov izoliranih iz ustne votline, pri čemer so testirali njihov protimikrobni učinek na parodontalno patogene bakterije. Tako sta v raziskavi Samot in Badet (2013) preučevala probiotični potencial avtohtonih laktobacilov iz ustne votline. V ta namen sta izolirala 66 sevov laktobacilov iz sline in jih nagojila na MRS gojišču (Gojišče De Man, Rogosa, Sharpe) pri 37 °C. Protimikrobni učinek izoliranih laktobacilov sta ugotavljala na različne kariogene in parodontalno patogene seve (*F. nucleatum* in *P. gingivalis*). Ugotovila sta, da je izmed 66 testiranih sevov 52 sevov pokazalo šibko inhibicijo parodontalno patogenih sevov (54).

V naši raziskavi smo izolirali različne bakterijske vrste s protimikrobnim učinkom na parodontalno patogene bakterije. Kljub temu da v večini raziskav proučujejo laktobacile, se mi za ta pristop nismo odločili, ker laktobacili proizvajajo lahkohlapne maščobne kisline, ki raztapljajo površino zoba in s tem povečajo tveganje za nastanek kariesa. Lahkohlapne maščobne kisline so prav tako substrat za anaerobne bakterije. Laktobacilov tako ni smiselno uporabiti za zdravljenje parodontalne bolezni.

Za raziskavo smo izbrali posameznike z majhnim številom zalivk na zobeh ter brez kariesa in parodontalne bolezni, da bi bakterije s protimikrobnim učinkom izolirali iz zdrave ustne votline. Vzorčenje ustne votline smo izvedli v različnih časovnih točkah t.j. jutranje, popoldansko vzorčenje in t.i. vzorčenje z minimalnim vplivom hrane. Namen jutranjega vzorčenja je bil pridobiti indigeno mikrobioto, zato si prostovoljci zjutraj niso umili zob in 12 h pred izvedbo vzorčenja uživali hrane. Indigena mikrobiota je definirana kot skupnost vseh mikroorganizmov v določenem habitatu (avtohtona in normalna mikrobiota ter patogeni mikroorganizmi). Avtohotni mikroorganizmi so tisti mikroorganizmi, ki so skozi evolucijo dosegli sožitje s svojim gostiteljem in so vse življenje konstantno prisotni v velikem številu. Normalna mikrobiota je skupnost mikroorganizmov, ki so normalno prisotni v določeni skupnosti gostitelja (55). Pri popoldanskem vzorčenju je bil naš namen preučiti vpliv vnosa hrane (imigrantov) na pojavnost sevov bakterij s protimikrobnim učinkom. S t.i. vzorčenjem z minimalnim vplivom hrane, pri katerem prostovoljci do vzorčenja niso uživali hrane, smo želeli izolirati avtohtono mikrobioto v ustni votlini. Ob vnosu hrane kontaminiramo indigeno mikrobioto v ustni votlini z imigranti iz hrane. Pri pomanjkljivem vnosu hrane se predvideva, da se obogati združba, ki je avtohtona med

indigeno. Ker obstajajo različni ekološki biotopi v ustni votlini in smo želeli preveriti kako le ti vplivajo na pojavnost sevov s protimikrobnim učinkom, smo vzorčenje ustne votline izvedli na štirih različnih mestih. Po vzorčenju je sledilo gojenje izoliranih bakterijskih sevov. Odločili smo se za različna neselektivna in selektivna gojišča iz katerih smo hoteli izolirati različne bakterije (gram pozitivne bakterije, aktinomicete itd.). Prav tako smo uporabili različne pogoje inkubiranja, to sta prisotnost/odsotnost kisika in različna temperatura. Odločili smo se za dve temperaturi, 37 °C, ki je ugodnejša za rast avtohtonih bakterij, in 30 °C, ki ugodnejša za rast imigrantov iz hrane. Aerobno smo inkubirali seve, ki smo jih izolirali na gojiščih NB in BHI. Da bi izolirali aktinomicete, ki izločajo protimikrobne snovi, pa smo se odločili za gojišče Emerson in gojišče z ovsenimi kosmiči in anaerobno inkubacijo.

V študiji so Essche in sodelavci preučevali pojavnost komenzalnih bakterij, ki imajo koristne lastnosti, in njihov protimikrobni učinek. Odvzeli so vzorce subgingivalnega biofilma s sterilnimi papirnati zobotrebcu pri 16 zdravih posameznikih in pri 19 posameznikih s parodontalno boleznijo. Po enem tednu inkubiranja so testirali bakterijske kolonije na različne parodontalne patogene seve s tehniko prelivnega agarja. S to tehniko so izolirali kolonije z inhibitornim učinkom iz vzorcev 9 posameznikov, pri čemer ni bilo opaziti razlike med posamezniki z zdravimi zobmi in tistimi s parodontalno boleznijo. Pri teh posameznikih so skupno izolirali 74 kolonij z inhibitornim učinkom, kar je predstavljalo 4,23 % od celotnega števila izoliranih kolonij. Opazili so, da je od skupno 39 kolonij, ki inhibirajo *P. intermedia*, bilo le 15 kolonij izoliranih iz posameznikov z zdravimi zobmi. 23 kolonij pa je inhibiralo *P. gingivalis*, pri čemer so jih 20 izolirali iz ustne votline zdravih posameznikov. Pri *A. actinomycetemcomitans* in *F. nucleatum* teh razlik ni bilo opaziti. Pri testiranju 74 kolonij z inhibitornim učinkom na več parodontalno patogenih sevov so uporabili metodo z diski. Samo 48 izolatov je pokazalo inhibitorni učinek na ≥ 1 parodontalno patogeni sev. Ugotovili so, da je razširjenost sevov z inhibitornim učinkom proti *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, in *A. actinomycetemcomitans* večja pri zdravih posameznikih, kot pri posameznikih s parodontalno boleznijo (56).

V primerjavi z raziskavo, ki so jo izvedli Essche in sodelavci je v naši raziskavi izmed 115 testiranih bakterijskih sevov 35 imelo protimikrobni učinek na *E. coli* (30,4 % sevov). V naši raziskavi smo tako dobili bistveno večji delež sevov s protimikrobnim učinkom. Predvidevamo, da je do takšne razlike prišlo zaradi drugačnih predpostavk, ki smo jih

postavili v naši raziskavi. Večina sevov, ki so imeli protimikrobni učinek na *E. coli*, je bila izolirana iz gojišča Emerson in gojišča z ovsenimi kosmiči. Večji protimikrobni učinek so pokazali sevi izolirani z jutranjim vzorčenjem kot sevi, ki smo jih izolirali s popoldanskim vzorčenjem. Iz vseh mest vzorčenja (bukalna sluznica, zobje, slina, jezik) smo izolirali seve s protimikrobnim učinkom, pri čemer je bilo največ sevov, ki je pokazalo protimikrobni učinek, izoliranih iz jezika. 34 sevov s protimikrobnim učinkom na *E.coli* smo nato testirali še na parodontalno patogeni sev *A. actinomycetemcomitans*, pri čemer jih je imelo 15 protimikrobni učinek (44,1 % sevov), kar je bistveno večji delež kot v raziskavi, ki so jo izvedli Essche in sodelavci. Večji protimikrobni učinek so pokazali sevi, ki so bili izolirani s popoldanski vzorčenjem, kot sevi, ki so bili izolirani z jutranjim vzorčenjem. Največ sevov, ki je pokazalo protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans*, je bilo iz sline.

Predvidevali smo, da bo zaradi kompleksnega biofilma na površini zob večja kompeticija med bakterijami in bodo zato bakterije izločale več protimikrobnih snovi, da se bodo obdržale v ekološki niši. Zato smo pričakovali, da bomo največ sevov s protimikrobnim učinkom izolirali s površine zob. Naši rezultati so bili drugačni od pričakovanih, namreč večina sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* je bilo izoliranih iz sline. Da bi lahko natančneje ovrednotili vpliv mesta (površine zob) v ustni votlini na pojavnost sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans*, bi morali testirati večjo skupino prostovoljcev.

V naši raziskavi smo predvidevali, da bomo več sevov s protimikrobnim učinkom izolirali z imigranti iz hrane, ker bodo le ti najverjetneje izločali več protimikrobnih snovi, da se bodo obdržali v ekološki niši. Na podlagi rezultatov vseh testiranih bakterijskih sevov izoliranih s popoldanskim vzorčenjem smo našo predpostavko tudi potrdili. Obstajata dve teoriji, ki govorita o dejavnikih, ki vplivajo na oblikovanje ekološke skupnosti. Tradicionalna teorija (nična hipoteza), ki izhaja iz ekološke niše in trdi, da deterministični abiotski in biotski dejavniki, kot so okoljski pogoji, heterogenost habitata in interakcije med vrstami določajo prisotnost oz. odsotnost določene vrste. V nasprotju pa nevtralna teorija temelji na naključnih procesih kot so rojstvo, smrt, kolonizacija, imigracija in emigracija. Zato sestava mikrobne združbe ni v celoti oblikovana na podlagi okoljskih pogojev in je odvisna tudi od nevtralnih procesov (57,58). Študij, ki bi eksperimentalno raziskovale taksonomsko sestavo mikrobnih imigrantov ali potencialni vpliv imigracije na potek strukturiranja mikrobne

združbe, je do danes malo (59). V naši raziskavi smo tako pokazali, da obe teoriji pomembno vplivata na strukturiranje mikrobne združbe.

Pomemben dejavnik, ki je vplival na izolacijo sevov s protimikrobno aktivnostjo, je bil tudi medij, ki smo ga uporabili za izolacijo. Največ sevov s protimikrobnim učinkom smo izolirali iz gojišč, ki so vsebovala manj hranil (gojišče z ovsenimi kosmiči, gojišče Emerson) v primerjavi z gojiščem, kjer je bilo na voljo več hranil (gojišče BHI). Sestava gojišča selekcionira rast določenih bakterij, zato smo uporabili gojišča bogata s hranili in gojišča, ki so vsebovala manj hranil (oligotrofna gojišča). Tako smo lahko izolirali bakterije, ki so prilagojene na različne koncentracije hranil. S hrano smo v ustni votlini zagotovili dodatna hranila, ki spreminjajo pogoje okolja in s tem vplivajo, da se bakterije v ustni votlini razraščajo. Na gojiščih bogatih s hranili se bakterije hitro delijo. Na oligotrofnih gojiščih pa se bakterije ne morejo hitro deliti in zato producirajo protimikrobne snovi, da se ohranijo v ekološki niši. Tako smo predvidevali, da bomo več bakterij s protimikrobnim učinkom izolirali iz oligotrofnih gojišč, kar smo tekom raziskave tudi potrdili.

V naši raziskavi smo razvili metodo testiranja protimikrobnega učinka na izbrani patogeni bakteriji (*E.coli* in *A. actinomycetemcomitans*). Potencialni sev s protimikrobnim učinkom lahko deluje na dva načina na parodontalno patogene seve. Prvi način je izločanje sekundarnih metabolitov s protimikrobnim delovanjem. Drugi načina pa je kompeticija v rasti in inhibicija rasti parodontalno patogenih sevov (50). V naši raziskavi smo protimikrobno učinkovitost določili tako, da smo merili premer cone lize na patogeni sev. Ugotovili smo, da sta se coni lize testiranega seva na *E.coli* in *A. actinomycetemcomitans* razlikovali. Znano je, da pH, temperatura in sestava gojišč vplivajo na izločanje protimikrobnih snovi in s tem na velikost cone lize. Stopnja aktivnosti protimikrobnih substanc ni vedno v korelaciji z celično biomaso ali stopnjo rasti seva, ki proizvaja protimikrobne substance. Na indukcijo sproščanja protimikrobnih substanc tako vplivata izbor medija in pogoji inkubiranja, kar je potrebno upoštevati pri interpretaciji rezultatov določanja protimikrobnega učinka (60). V naši raziskavi je do razlik v premeru lize lahko prišlo zaradi omenjenih razlogov. Premer cone lize na *E.coli* smo odčitali po 24 h, medtem ko smo končni premer cone lize na *A. actinomycetemcomitans* odčitali po 72 h. Možno je, da je bila hitrost difuzije bakteriocina počasna in je dosegla vrh šele po nekaj dnevni inkubaciji. Iz tega razloga bi lahko dobili drugačne rezultate, če bi odčitali premer cone lize na *E. coli* po 72 h. Pri izvedbi testov na omenjeni patogeni bakteriji smo uporabili različna

medija za testiranje protimikrobnega učinka. Sev *E.coli* smo gojili na gojišču NA, medtem ko smo sev *A. actinomycetemcomitans* gojili na gojišču BHI, ki je optimalno za rast te bakterije.

Naši rezultati premera cone lize na *A. actinomycetemcomitans* nakazujejo, da imajo določeni izolirani bakterijski sevi zelo dobro sposobnost izločanja protimikrobnih snovi. Povprečni premer cone lize na *A. actinomycetemcomitans* sevov izoliranih iz gojišča Emerson je bil 0,29 cm (SD = 0,18 cm), iz gojišča z ovsenimi kosmiči pa 0,15 cm (SD = 0,06 cm). Glede na podatke vidimo, da je na gojišču Emerson velik raztros vrednosti v premeru lize med testiranimi sevi. Zaključimo lahko, da iz gojišča Emerson dobimo seve, ki izločajo različne protimikrobne snovi v večjih količinah kot sevi izolirani iz gojišča z ovsenimi kosmiči.

V naši raziskavi smo med drugim preverili, ali število zalivk na zobeh vpliva na pojavnost bakterij s protimikrobnim učinkom. Ugotovili smo, da ima število zalivk majhen vpliv na pojavnost bakterij s protimikrobnim učinkom, vendar korelacija ni statistično značilna. Kljub temu, da korelacije ne moremo potrditi, je bilo v rezultatih opaziti, da smo iz vzorcev oseb z malo zalivkami (0-2 zalivki) izolirali več sevov s protimikrobnim učinkom. Prav tako smo opazili negativno korelacijo med velikostjo cone lize na *A. actinomycetemcomitans* in številom zalivk v ustni votlini, pri čemer korelacija ni statistično značilna. Da bi lahko trdili, da število zalivk vpliva na prisotnost sevov s protimikrobnim učinkom v ustni votlini, bi morali opraviti obsežnejšo raziskavo, ki bi zajela večje število posameznikov (vsaj 1000 posameznikov).

V naši raziskavi smo z gojitvenimi metodami in nadaljnjo molekularno identifikacijo prišli do zaključka, da je večina sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* iz roda *Bacillus*. Poleg roda *Bacillus* sta dva seva pripadala rodu *Staphylococcus* in en sev rodu *Stenotrophomonas*. V starejši literaturi najdemo domneve, da je pojavnost roda *Bacillus* v ustni votlini majhna. Marsh in Martin sta zapisala, da se rod *Bacillus* pogosto obravnava kot prehodna mikrobiota v ustni votlini (61). Med našim raziskovanjem smo iz ustne votline oralno zdravih posameznikov izolirali bakterije roda *Bacillus* in dokazali njihov protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans*. Naša raziskava je pokazala drugačne rezultate kot sta zapisala Marsh in Martin in je tako prva študija s katero smo dokazali prisotnost roda *Bacillus* v ustni votlini.

Za rod *Bacillus* je znano, da izloča številne protimikrobne snovi, vključno s peptidnimi in lipopeptidnimi antibiotiki, bakteriocini in bakteriocinom podobnimi inhibitornimi spojinami (ang. BLIS). Protimikrobne snovi, ki jih izloča rod *Bacillus*, postajajo vedno bolj pomembne predvsem zaradi njihovega širokega spektra inhibicije, ki vključuje Gram negativne in pozitivne bakterije, kvasovke in glive. Prav tako je prednost roda *Bacillus* sporulacija (bakterija se spremeni iz metabolno aktivne celice v metabolno neaktivno), kar bakteriji omogoča izjemno odpornost na zunanje pogoje in zmožnost preživetja v različnih habitatih (62). Protimikrobni učinek rodu *Bacillus* so *in vivo* potrdili tudi v študiji, ki jo je izvedel Tsubura in sodelavci. V tej raziskavi se je *B. subtilis* izkazal kot učinkovit probiotični mikroorganizem. Odkrili so, da se je pri bolnikih s kronično parodontalno boleznijo ob uporabi ustne vode, ki je vsebovala *B. subtilis* DB9011, občutno zmanjšalo število parodontalnih patogenov v primerjavi z bolniki, ki so uporabljali komercialno ustno vodo z benzetonijskim kloridom (63). V drugi študiji, ki so jo prav tako izvedli Tsubura in sodelavci, so preučevali vpliv tablet, ki so vsebovale *B. subtilis* DB9011 na parodontalno patogene bakterije. Po 30 dnevni uporabi se je signifikantno zmanjšalo število parodontalno patogenih vrst v vzorcih sline in bakterijskega plaka (64).

Ker je aktualen način zdravljenja parodontalne bolezni večinoma usmerjen le v odpravljanje posledic in tako dolgoročno ni učinkovit, lahko na podlagi naše raziskave predlagamo nov pristop zdravljenja parodontalne bolezni. Le-ta bi temeljil na razvoju nove farmacevtske oblike, ki bi vključevala probiotični sev rodu *Bacillus*. Takšno farmacevtsko obliko bi lokalno vnesli v obzobne žepe in s tem omogočili rekolonizacijo parodontalnih žepov in nastanek zdravega zobnega biofilma. Na podlagi naše raziskave in raziskave, ki so jo izvedli Tsubura in sodelavci, bi bilo smiselno uvesti rod *Bacillus* kot nov pristop zdravljenja parodontalne bolezni.

Na podlagi rezultatov filogenetskega drevesa dva seva, ki imata prav tako protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans*, sodita v rod *Staphylococcus*. V starejši literaturi sta Marsh in Martin zapisala, da so stafilokoki prehodni kolonizatorji ustne votline in se običajno ne štejejo kot del normalne oralne mikrobiote (65). V študiji, ki jo je izvedel Ikeda, je v slini zdravih oseb prevladoval in bil prisoten v velikih količinah *S. epidermidis*, kar kaže, da so stafilokoki del normalne oralne mikrobiote (66). Podobne rezultate je objavil tudi Ohara-Nemoto s sodelavci. Odkril so, da so stafilokoki prisotni v ustni votlini (67). V drugi raziskavi so Smith in sodelavci odkrili, da ima 94 % zdravih odraslih posameznikov ustno

votlino kolonizirano s *Staphylococcus* spp. s čimer so prav tako potrdili, da so stafilokoki del normalne oralne flore (68). Naši rezultati se ujemajo z novejšimi študijami in potrjujejo prisotnost stafilokokov v ustni votlini kot del normalne mikrobiote. Tako ustna votlina predstavlja doslej slabo poznan rezervoar za stafilokoke. Zanimivo je, da smo v naši raziskavi odkrili protimikrobni učinek stafilokokov, vendar bi za potrditev protimikrobnega učinka morali narediti še dodatna testiranja. Do sedaj protimikrobnega učinka stafilokokov iz ustne votline niso opazili.

V naši raziskavi smo en izoliran sev uvrstili v rod *Stenotrophomonas*. Ta rezultat je presenetljiv, ker do sedaj v drugih raziskavah tega roda niso opazili. Iz filogenetskega drevesa je razvidno, da se okrog tega seva grupira veliko nekultivabilnih mikroorganizmov. Da bi odkrili pomen tega roda v ustni votlini, bi morali narediti bolj specifično raziskavo.

Na podlagi naših rezultatov pridobljenih tekom celotne raziskave lahko povzamemo kakšna je idealna oseba primerna za vzorčenje ustne votline, s katerim dobimo seve s protimikrobnim učinkom na parodontalno patogeni sev *A. actinomycetemcomitans* (preglednica V).

Preglednica V: Protokol izbora prostovoljcev in vzorčenja za izolacijo sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans*.

SPOL	Moški
STAROST	23-32
ŠTEVILO ZALIVK	največ 1
MESTO VZORČENJA	Zobje, bukalna sluznica
ČASOVNA TOČKA VZORČENJA	Popoldansko vzorčenje
GOJIŠČE ZA IZOLACIJO	Gojišče Emerson
PROTOKOL	Oseba spi vsaj 1 L tekočine in zaužije vsaj en obrok

SPOL	Ženska
STAROST	23-32
ŠTEVILO ZALIVK	največ 4
MESTO VZORČENJA	Slina, jezik
ČASOVNA TOČKA VZORČENJA	Jutranje vzorčenje
GOJIŠČE ZA IZOLACIJO	Gojišče z ovsenimi kosmiči
PROTOKOL	Oseba si cca. 12 h pred vzorčenjem ne umiva zob in uživa hrane in pijače

6. SKLEPI

- Bakterijski sevi iz ustne votline imajo protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans* ne glede na časovno točko vzorčenja.
- Bakterijski sevi, izolirani iz vseh proučevanih mest v ustni votlini (bukalna sluznica, slina, jezik in zobje) imajo protimikrobni učinek na *A. actinomycetemcomitans*.
- Večji delež bakterijskih sevov s protimikrobnim učinkom smo izolirali iz oligotrofnih gojišč.
- Osebe z manjšim številom zalivk na zobeh imajo v ustni votlini več bakterijskih sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* (obstaja korelacija, vendar je statistično neznačilna; za potrditev korelacije bi bilo potrebno testirati večje število oseb).
- Največ izoliranih bakterijskih sevov s protimikrobnim učinkom na *A. actinomycetemcomitans* je iz rodu *Bacillus*.
- Raziskava je pokazala, da sta za zdravo ustno floro pomembni tako nična hipoteza kot hipoteza emigracije in imigracije.

7. LITERATURA

1. Marsh PD, Lewis M, Williams D: Oral microbiology. 5th ed. Elsevier health sciences; 2009.
2. Seme K: Normalna mikrobna flora. Gubina M, Ihan A, editors. Medicinski razgledi 2002;59–64.
3. Marsh PD: Role of the oral microflora in health. Microb Ecol Health Dis 2000;12(5):130–137.
4. Vargas SA, Ilyina A: Etiology and microbiology of periodontal diseases: A review. African J Microbiol Res 2015;9(48):2300–2306.
5. Marsh PD, Devine DA: How is the development of dental biofilms influenced by the host? J Clin Periodontol 2011;38(11):28–35.
6. Aframian D, Davidowitz T, Benoliel R: The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. Oral Dis 2006;12(4):420–423.
7. Loke C, Lee J, Sander S, Mei L, Farella M: Factors affecting intra-oral pH - a review. J Oral Rehabil 2016;43(10):778–785.
8. Olsen I: New principles in ecological regulation - Features from the oral cavity. Microb Ecol Health Dis 2006;18(1):26–31.
9. Bowden GH, Li YH: Nutritional influences on biofilm development. Adv Dent Res 1997;11(1):81–89.
10. Lamont RJ, Hajishengallis GM, Jenkinson HF, editors: Oral Microbiology and Immunology. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2014.
11. Lederberg J, Mccray AT: Ome SweetOmics--A Genealogical Treasury of Words. Sci 2001;15(7):8–8.
12. Hooper L V, Littman DR, Macpherson AJ: Interactions Between the Microbiota and the Immune System. Science (80-) 2012;336(6086):1268–1273.
13. Wescombe PA, Tagg JR: Streptococcal bacteriocins and the case for Streptococcus salivarius as model oral probiotics. Future Microbiol 2009;4:819–835.
14. Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ: A preliminary study of the effect of probiotic Streptococcus salivarius k12 on oral malodour parameters. J Appl Microbiol 2006;100(4):754–764.
15. Sullivan A, Edlund C: Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. Lancet Infect Dis 2001;1(2):101–114.
16. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD: Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. J Clin Periodontol 2003;30(7):644–54.
17. Van Nieuw Amerongen, A Bolscher JG, Veerman EC: Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res 2004;38(3):247–253.
18. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK: Health benefits of saliva: a review. J Dent 2005;33(3):223–233.
19. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM: Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. J Dent Res 2008;87(11):1016–1020.

20. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW: Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* [Internet] 2002;56(October):187–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142477>
21. Socransky SS, Haffajee AD: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002;28:12–55.
22. Stopar D, Odić D, Mahne I: Praktikum iz mikrobne ekologije za študente biologije. 2015.
23. Marsh PD: Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004;38(3):204–211.
24. Kolenbrander PE, Palmer RJJ: Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 2006;42:47–79.
25. Listgarten MA: The structure of dental plaque. *Periodontol 2000* 1994;5:52–65.
26. Kolenbrander PE, London J: Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993;175(11):3247–3252.
27. Kolenbrander PE, Andersen DL, Clemans CJ: Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. In: *Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease* Cardiff: Bioline; 1999. p. 171–186.
28. Bradshaw DJ, Marsh PD: Role of *Fusobacterium nucleatum* and Coaggregation in Anaerobe Survival in Planktonic and Biofilm Oral Microbial Communities during Aeration. *Infect Immun* 1998;66(10):4729–4732.
29. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH: *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology* 2002;148:467–472.
30. Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L: Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001;45(5):471–476.
31. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE: Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 2003;11(2):94–100.
32. Yamamoto M, Kobayashi R, Kono T: Induction of IL-10-producing CD4⁺ T-cells in Chronic Periodontitis. *J Dent Res* 2011;90(5):653–658.
33. Saini R, Saini S, R SS: Periodontal diseases: A risk factor to cardiovascular disease. *Ann Card Anaesth* 2010;13(2):159–161.
34. Nesbitt MJ, Reynolds MA, Shiau H, Choe K, Simonsick EM: Association of periodontitis and metabolic syndrome in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Aging Clin Exp Res* 2010;22(3):238–242.
35. Leroy R, Eaton KA, Savage A: Methodological issues in epidemiological studies of periodontitis - how can it be improved? *BMC Oral Health* 2010;10(8).
36. Lopez NJ, Da Silva I, Ipinza J, Gutierrez J: Periodontal Therapy Reduces the Rate of Preterm Low Birth Weight in Women With Pregnancy-Associated Gingivitis. *J Periodontol* 2005;76(11):2144–2153.
37. Paster BJ, Olsen I, Aas JA: The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006;42:80–87.
38. Hasan A, Palmer RM: A clinical guide to periodontology: Pathology of periodontal disease. *Br Dent J* 2014;216:457–461.

39. Haffajee AD, Socransky SS: Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000* 2005;28:9–12.
40. Ling L, Ho C, Wu C, Chen Y, Hung S: Association Between Human Herpesviruses and the Severity of Periodontitis. *J Periodontol* 2004;75(11):1479–1485.
41. Armitage GC: The complete periodontal examination. *Periodontol 2000* 2004;34:22–33.
42. Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V: Microbiology of Periodontal Diseases. A Review. *J Biotechnol Biotechnol Equip* 2014;27(3):3754–3759.
43. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR: Microbial complexes in supragingival plaque. 2008;23(3):196–205.
44. Raja M, Ummer F, Dhivakar CP: *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* – A Tooth Killer? *J Clin Diagnostic Res* 2014;8(8):13–16.
45. Periodontal (Gum) Disease: Causes, Symptoms, and Treatments. [Internet]. National Institute of Dental and Craniofacial Research Publication No. 13-1142. 2013 [cited 2017 Mar 1]. Available from: <https://www.nidcr.nih.gov/OralHealth/Topics/GumDiseases/PeriodontalGumDisease.htm>
46. Horwitz J, Machtei EE, Peled M, Laufer D: Amine fluoride/stannous fluoride and chlorhexidine mouthwashes as adjuncts to surgical periodontal therapy: a comparative study. *J Periodontol* 2000;71(10):1601–1606.
47. Walker CB: Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontol 2000* 1996;10:12–28.
48. Meurman JH: Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci* 2005;113(3):188–196.
49. Caglar E, Kargul B, Tanboga I: Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis* 2005;11(3):131–137.
50. Stamatova I, Meurman JH: Probiotics and periodontal disease. *Periodontol 2000* 2009;51(1):141–151.
51. Hojo K, Mizoguchi C, Taketomo N, Ohshima T, Gomi K: Distribution of salivary *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in periodontal health and disease. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71(1):152–157.
52. Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H: Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(6):354–361.
53. Yli-Knuutila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH: Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Mol Oral Microbiol* 2006;21(2):129–131.
54. Samot J, Badet C: Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe* 2013;19:34–48.
55. Dubos R, Schaedler RW, Costello R, Hoet P: Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 1965;122(1):67.
56. van Essche M, Loozen G, Godts C, Boon N, Pauwels M: Bacterial antagonism against periodontopathogens. *J Periodontol* 2013;84(6):801–811.

57. Liao J, Cao X, Zhao L, Wang J, Gao Z, Wang MC, Huang Y: The importance of neutral and niche processes for bacterial community assembly differs between habitat generalists and specialists. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;92(11):1–34.
58. Lee JE: Niche and neutral processes in aquatic bacterial communities: Are all things equal? Lincoln University; 2014.
59. Sloan WT, Lunn M, Woodcock S, Head IM: Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ Microbiol* 2006;8(4):732–740.
60. Wang O, Cui Y, Lackeyram D, Xu L: Effect of cultural components on antimicrobial activity of bacteriocin produced by bacteria isolated from gut of poultry. *African J Microbiol Res* 2010;4(19):1970–1980.
61. Marsh PD, V MM: Oral micorbiology. 1st ed. Springer US; 1992.
62. Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A: Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35(1):201–232.
63. Tsubura S, Mizunuma H, Ishikawa S, Oyake I: The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(11):1353–1356.
64. Tsubura S, Waki Y, Tsubura T: Probiotic effect of *Bacillus subtilis* tablets on periodontopathic oral bacteria. *Microbiol Res (Pavia)* 2012;3(23).
65. Marsh PD: Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8(AUGUST 1994):263–271.
66. Ikeda Y, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Ishibashi K, Kikuchi K: PCR-based identification of *Staphylococcus epidermidis* targeting *gseA* encoding the glutamic-acid-specific protease. *Can J Microbiol* 2004;50(7):493–498.
67. Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S, Nemoto TK: Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. *J Med Microbiol* 2008;57:95–99.
68. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J: The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol* 2001;50(11):940–946.

8. PRILOGE

PRILOGA I: Izolirani bakterijski sevi iz ustne votline

Bakterijske seve smo označili pri čemer prva številka oznake predstavlja številko prostovoljca, druga številka časovno točko vzorčenja (1 – zjutraj (pred hrano), 2 – popoldan (po hrani), 3 – vzorčenje z minimalnim vplivom hrane), sledi črka, ki označuje mesto vzorčenja v ustni votlini (M – bukalna sluznica, J – jezik, Z – zobje, S – slina). Vse bakterijske seve smo morfološko opisali in izračunali CFU (colony forming unit). Prav tako smo zabeležili datum izolacije in pogoje gojenja.

Preglednica VI: Izolirani bakterijski sevi

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
BHI	15.05.2015	aerobno, 37 °C	1.1.Z	belo rumena kolonija, ki se nahaja v skupkih	4,80E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	1.1.J	svetlo rumena, okrogla kolonija z nepravilnim robom	1,76E+08
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	2.1.S	rumeno oranžna, nagubana kolonija, ki se nahaja v skupkih	5,40E+09
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	2.1.Z	drobcena belo rjava kolonija, ki se nahaja v skupkih	4,80E+07
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	2.1.J	rumeno rjava, okrogla kolonija	2,50E+06
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.M	rumeno bela, nagubana kolonija -1-	5,30E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.M	rumeno bela, okrogla kolonija -2-	5,30E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.J	svetlo rumeno bela, okrogla kolonija	2,50E+06
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.S	bela kolonija z malo nazobčanim robom	2,70E+08
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.Z	bela, nagubana kolonija -1-	6,00E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.Z	majhna bela, okrogla kolonija -2-	6,00E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	4.1.J	bela kolonija v obliki rožice	2,00E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	4.1.S	rumena pahljačasta kolonija z nazobčanim robom	3,90E+09
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	5.1.J	bela rjava kolonija v obliki pahljače	1,50E+06
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	5.1.M	bela, okrogla kolonija	8,80E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	6.1.S	bela kolonija v obliki pahljače	5,80E+09
15.05.2015	aerobno, 37 °C	6.1.Z	prosojno bela pikčasta kolonija	4,10E+07	

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
BHI	15.05.2015	aerobno, 30 °C	3.2.J	bela pahljačasta kolonija -1-	5,90E+07
	15.05.2015	aerobno, 30 °C	3.2.J	rumena kolonija z nepravilnim robom -2-	5,90E+07
	15.05.2015	aerobno, 30 °C	4.2.Z	temno rumeno rjava, nagubana kolonija -1-	6,50E+07
	15.05.2015	aerobno, 30 °C	4.2.Z	svetlo rumena, okrogla kolonija z nepravilnim robom -2-	7,00E+07
	15.05.2015	aerobno, 30 °C	5.2.Z	rumeno rjava, okrogla kolonija	1,00E+08
	15.05.2015	aerobno, 30 °C	5.2.J	prosojno bela, okrogla kolonija	5,50E+07
	18.05.2015	aerobno, 30 °C	1.2.J	bela, okrogla kolonija s svetlim robom	5,20E+05
	18.05.2015	aerobno, 30 °C	1.2.Z	prosojna grudasta kolonija	1,00E+08
	18.05.2015	aerobno, 30 °C	2.2.J	okroglo pahljačasta kolonija	7,00E+05
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	6.2.J	rumena okrogla kolonija	4,10E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.Z	svetlo rumena do bela okrogla kolonija	2,50E+06
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.M	rumena kolonija, s temnejšo notranjostjo -1-	5,50E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.M	temno rumena kolonija -2-	5,50E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.S	rumena okrogla kolonija s svetlim robom -1-	3,60E+09
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.S	rjava kolonija v obliki pahljače -2-	3,60E+09
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	8.1.Z	rumena okrogla, mazljiva kolonija	3,80E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	8.1.S	rumena svetleča kolonija nepravilne oblike	8,40E+09
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	9.1.Z	svetlo rumeno rjava, okrogla kolonija -1-	5,60E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	9.1.Z	svetlo prosojna pikčasta kolonija -2-	5,60E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	9.1.J	svetlo rumena pikčasta kolonija	1,66E+08
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	9.1.M	rjava okrogla kolonija s svetlim robom	8,70E+05
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	8.2.Z	bela velika pahljačasta kolonija	1,23E+08
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	8.2.J	bela pahljačasta kolonija	8,10E+07
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	9.2.Z	bela okrogla kolonija s tankim svetlim robom	7,60E+07
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	9.2.S	bela kolonija s temnejšo notranjostjo, okrogle oblike	6,00E+09
	25.05.2015	aerobno, 37 °C	10.1.Z	bela okrogla kolonija z dvema kolobarjema (notranji svetlejši)	1,45E+06
	25.05.2015	aerobno, 37 °C	10.1.S	belo rumena pikčasta kolonija nepravilne oblike	4,80E+09
	25.05.2015	aerobno, 37 °C	11.1.J	sijoče rumena razpacana kolonija	4,60E+07
	25.05.2015	aerobno, 37 °C	11.1.Z	svetlo rumena okrogla kolonija	1,50E+08

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
BHI	25.05.2015	aerobno, 30 °C	10.2.Z	bela pikčasta kolonija	5,70E+07
	25.05.2015	aerobno, 30 °C	10.2.J	okrogla rjava kolonija s prosojnim robom	5,30E+04
	25.05.2015	aerobno, 30 °C	11.2.M	rumena okrogla kolonija s tankim svetlim robom	2,20E+06
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	13.1.Z	svetlo rumena kolonija	5,70E+07
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	14.1.S	svetlo rumena kolonija s svetlim robom	9,60E+07
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	14.1.M	belo prosojna kolonija	5,40E+05
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	14.1.Z	bela okrogla pikčasta kolonija	1,22E+06
	27.05.2015	aerobno, 30 °C	16.2.J	bela kolonija s svetlim nazobčanim robom	1,64E+08
	27.05.2015	aerobno, 30 °C	16.2.Z	belo oranžna okrogla kolonija	6,50E+07
	27.05.2015	aerobno, 30 °C	15.2.Z	drobna prosojna pikčasta kolonija	3,70E+07
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	17.1.Z	kremno bela kolonija	1,10E+06
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	15.1.M	bela pikčasta kolonija z nazobčanim robom	1,66E+06
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	15.1.S	bela kolonija, ki se širi kot pahljača	3,50E+09
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	15.1.J	bela kolonija s svetlim robom	1,42E+06
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	16.1.J	svetlo rumeno rjava kolonija s svetlim tankim nazobčanim robom	8,90E+07
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	16.1.Z	svetla prosojno bela kolonija	1,84E+06
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	17.1.J	bela nazobčana kolonija	9,70E+07
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	17.1.S	bela okrogla kolonija	4,40E+09
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	16.2.S	rumeno rjava okrogla kolonija	2,06E+08
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	15.2.J	rjava kolonija s svetlim robom	9,40E+05
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	17.2.J	bela okrogla kolonija z nazobčanim robom	1,16E+06
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	17.2.S	svetlo rjava okrogla kolonija, ki je v notranjosti temnejša	8,60E+07
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	13.2.J	bela okrogla kolonija	7,50E+07
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	13.2.Z	belo prosojna kolonija	7,30E+05
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	14.2.J	bela drobcena kolonija nepravilne oblike	1,38E+08
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	18.1.Z	nepravilna bela kolonija	1,10E+06
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	18.1.M	belo-prosojna nepravilna kolonija	8,50E+05
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	18.1.S	svetleča bež kolonija	2,60E+08
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	19.1.S	bela okrogla deloma nepravilne oblike kolonije s svetlim robom	2,34E+10

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
BHI	3.06.2015	aerobno, 37 °C	22.1.J	bela kolonija nepravilne oblike	1,92E+08
	3.06.2015	aerobno, 30 °C	18.2.J	prozorna okrogla kolonija	5,40E+07
	3.06.2015	aerobno, 30 °C	18.2.M	bela do bež, malo rjava, okrogla kolonija	1,15E+06
	3.06.2015	aerobno, 30 °C	18.2.Z	mala bela kolonija	8,40E+04
	3.06.2015	aerobno, 30 °C	19.2.S	okrogla bela do bež kolonija	1,34E+10
	3.06.2015	aerobno, 30 °C	19.2.Z	pikčasta prozorna kolonija (nepravilen rob kolonije)	3,30E+07
	3.06.2015	aerobno, 30 °C	22.2.J	temnejša notranjost, okrog svetlo bež rob, nepravilne oblike	7,30E+07
	3.06.2015	aerobno, 30 °C	22.2.S	majhna pikčasta kolonija s temnejšo notranjostjo	8,70E+09
	3.06.2015	aerobno, 30 °C	22.2.Z	droben bel skupek	7,10E+05
	17.06.2015	aerobno, 37 °C	20.1.J	razvejena rumena kolonija v obliki rožice	1,76E+08
	17.06.2015	aerobno, 37 °C	20.1.M	bela do svetlo rumena kolonija nepravilne oblike	2,50E+06
	17.06.2015	aerobno, 37 °C	20.1.Z	rumena nepravilna kolonija, ki se nahaja v skupkih	4,00E+07
	17.06.2015	aerobno, 37 °C	21.1.J	bela, nepravilna kolonija v obliki pahljače	2,00E+08
	17.06.2015	aerobno, 37 °C	23.1.S	bela, malo nazobčana kolonija	4,50E+09
	17.06.2015	aerobno, 37 °C	23.1.M	bela, drobna, malo svetleča kolonija	4,40E+05
	17.06.2015	aerobno, 37 °C	24.1.Z	rumena okrogla s tanek svetlim robom	2,80E+06
	17.06.2015	aerobno, 37 °C	24.1.M	rumena kolonija, ki je razrastla kot rožica	2,00E+06
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	21.2.J	svetla bela pahljača, v notranjosti rumena pikica	3,80E+07
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	21.2.Z	rumen majhen skupek	1,96E+08
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	20.2.Z	svetlo bela okrogla pika	1,75E+08
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	20.2.S	svetel skupek	8,00E+09
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	23.2.S	velika, okrogla bela kolonija	3,20E+09
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	23.2.Z	okrogla, malo prosojna kolonija	2,50E+07
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	24.2.Z	bela, malo grudasta kolonija -1-	1,00E+08
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	24.2.Z	svetel skupek -2-	1,00E+08
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	24.2.S	temno rumena okrogla -1-	1,20E+08
	19.06.2015	aerobno, 30 °C	24.2.S	drobna bela kolonija -2-	1,20E+08
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	12.1.J	drobne bele pikice -1-	9,60E+07
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	12.1.Z	rumene okrogle pikice	6,30E+07

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
BHI	8.07.2015	aerobno, 37 °C	25.1.J	drobne prosojne pikice -1-	8,50E+07
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	25.1.Z	beli skupki	1,43E+08
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	26.1.J	okrogla, belo rumena pikčasta kolonija	1,48E+08
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	27.1.J	belo prosojna okrogla kolonija	1,80E+07
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	27.1.S	bela, malo pahljačasta kolonija -1-	6,40E+09
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	27.1.S	skupek belo prosojne barve -2-	6,40E+09
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	28.1.M	bela okrogla kolonija	1,72E+06
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	28.1.J	rumena, malo pahljačasta kolonija	3,90E+07
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	29.1.Z	drobna bela pikica	2,80E+08
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	30.2.S	beli skupek, malo nazobčan -1-	8,30E+07
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	30.2.S	svetlo bela kolonija nepravilne oblike -2-	8,30E+07
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	29.2.M	prosojna okrogla kolonija -1-	2,05E+06
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	29.2.M	rumena kolonija nepravilne oblike -2-	2,05E+06
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	27.2.Z	rumena mala kolonija, oblika rožice	8,20E+09
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	26.2.Z	okrogla velika rumena kolonija, znotraj mrežasta	7,40E+07
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	12.2.Z	bela okrogla kolonija	4,80E+07
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	27.2.S	bela okrogla kolonija, malo nazobčana	4,10E+09
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	12.2.J	okrogla prosojna kolonija v obliki drobnih pikic	9,90E+07
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	25.2.Z	okrogla bela kolonija, kot drobna pikica	7,40E+07
	15.07.2015	aerobno, 37 °C	25.1.J	okrogla bela kolonija -2-	8,20E+07
	15.07.2015	aerobno, 37 °C	12.1.J	beli skupek -2-	9,40E+07
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.Z	rumeno rjava okrogla kolonija	1,31E+08
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	27.3.J	svetlo rumena okrogla kolonija	1,30E+08
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.S	bela kolonija v obliki rožice -1-	6,20E+09
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.S	bela rožičasta kolonija -2-	9,60E+07
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.J	bela nepravilna kolonija	2,60E+10
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.S	bela okrogla kolonija	1,38E+06
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.M	okrogla bela kolonija	1,31E+08
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.Z	okrogla temno rjava kolonija	1,38E+06

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
BHI	7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.M	bela okrogla kolonija	2,50E+06
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.M	rjava okrogla kolonija z majhnim svetlim robom	6,20E+09
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	27.3.Z	rumeno rjava okrogla kolonija	2,28E+05
NB	15.05.2015	aerobno, 37 °C	1.1.J	bela, nagubana kolonija	1,80E+08
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	2.1.S	bela kolonija, ki se nahaja v skupkih	1,50E+08
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	2.1.Z	drobna svetlo rumena, okrogla kolonija	4,80E+07
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.S	prosojna okrogla kolonija z nazobčanim robom -1-	8,70E+07
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.S	bela kolonija, ki se nahaja v skupkih -2-	9,20E+07
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	4.1.J	bela, okrogla kolonija s svetlim robom	1,50E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	4.1.M	bela, okrogla kolonija	3,10E+05
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	5.1.S	rumena, nagubana kolonija -1-	3,30E+09
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	5.1.S	bela kolonija, ki se nahaja v skupkih -2-	3,30E+09
	15.05.2015	aerobno, 37 °C	6.1.S	bela, okrogla kolonija	9,80E+09
	15.05.2015	aerobno, 30 °C	3.2.S	zelo velika rumena okrogla kolonija	3,20E+09
	15.05.2015	aerobno, 30 °C	4.2.M	mala, živo rumena, gladka kolonija	1,67E+08
	15.05.2015	aerobno, 30 °C	5.2.Z	svetlo bela, majhna, okrogla kolonija	1,00E+08
	18.05.2015	aerobno, 30 °C	1.2.J	drobna bela kolonija s prosojnim robom	5,00E+05
	18.05.2015	aerobno, 30 °C	2.2.J	drobna bela kolonija	9,00E+05
	18.05.2015	aerobno, 37 °C	6.1.J	rumena, okrogla kolonija s svetlim robom -1-	4,70E+05
	18.05.2015	aerobno, 37 °C	6.1.J	bela kolonija z nazobčanim robom -2-	4,70E+05
	18.05.2015	aerobno, 37 °C	6.1.M	bela pikčasta kolonija, ki se širi kot pahljača	3,60E+05
	18.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.M	bela kolonija v skupkih (nagubana)	8,00E+05
	18.05.2015	aerobno, 37 °C	3.1.J	bela kolonija v skupkih	1,00E+06
	18.05.2015	aerobno, 37 °C	2.1.J	rumena, okrogla kolonija z nazobčanim svetlim robom	1,50E+06
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	6.2.Z	bela okrogla kolonij z majhnim prosojnim robom	3,50E+07
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	6.2.J	bela pikčasta na sredini, ki se širi kot pahljača -1-	3,80E+07
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	6.2.J	rumena kolonija, malo nazobčana -2-	4,20E+07

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
NB	22.05.2015	aerobno, 30 °C	3.2.Z	mala okrogla bela kolonija	4,90E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.M	majhna prosojno bela pikčasta kolonija -1-	7,70E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.M	rumena kolonija v skupkih -2-	7,50E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.Z	svetlo rumena, okrogla s svetlim robom	7,80E+05
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	7.1.J	rumeno svetleča kolonija nepravilne oblike	1,50E+06
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	8.1.J	rumena kolonija, okrog nje majhne pikice	4,90E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	8.1.M	mala rumena kolonij z, nepravilnim robom	1,00E+06
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	9.1.M	bela pikica	7,60E+07
	22.05.2015	aerobno, 37 °C	9.1.J	svetleča rumena okrogla kolonija z okroglim svetlim robom	4,00E+07
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	7.2.M	rumena okrogla kolonija	6,00E+05
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	7.2.Z	bela okrogla kolonija	5,90E+07
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	7.2.S	oranžno rumena okrogla kolonija	1,20E+08
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	8.2.J	sijoče rumena kolonija	5,80E+07
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	8.2.Z	belo rumena velika kolonija	3,40E+07
	22.05.2015	aerobno, 30 °C	9.2.Z	bela, znotraj temnejša kolonija okrogle oblike	6,80E+07
	25.05.2015	aerobno, 37 °C	10.1.M	prosojna nepravilna kolonija	1,05E+06
	25.05.2015	aerobno, 37 °C	11.1.S	rumena okrogla kolonija	2,50E+08
	25.05.2015	aerobno, 37 °C	11.1.J	svetlo rumena, okrogla kolonija s tankim prosojnim robom	2,28E+06
	25.05.2015	aerobno, 30 °C	10.2.Z	bela pikica	6,00E+07
	25.05.2015	aerobno, 30 °C	10.2.J	belo okrogla kolonija	4,60E+05
	25.05.2015	aerobno, 30 °C	11.2.M	bela okrogla kolonija	1,60E+06
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	13.1.Z	svetlo rumena - bež kolonija s majhnim svetlim robom	1,09E+08
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	13.1.S	rumena do svetlo bela kolonija s svetlim robom	3,90E+09
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	13.1.M	rumena, malo svetleča kolonija z nepravilnim robom	2,76E+06
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	14.1.S	živo rumena, okrogla kolonija	2,55E+08
	27.05.2015	aerobno, 37 °C	14.1.J	bela okrogla kolonija s svetlim rob	9,10E+07
	27.05.2015	aerobno, 30 °C	16.2.J	bela kolonija s tankim svetlim robom	4,40E+07

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
NB	27.05.2015	aerobno, 30 °C	16.2.Z	bela okrogla kolonija	4,00E+07
	27.05.2015	aerobno, 30 °C	15.2.M	drobna bela okrogla pika	7,40E+05
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	15.1.M	okrogla, skoraj prosojna bela kolonija z majhnim svetlim robom	7,80E+05
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	15.1.J	okrogla, skoraj prosojna bela kolonija	7,40E+05
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	16.1.J	bela, prosojna okrogla kolonija	1,35E+08
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	16.1.Z	drobcena bela kolonija	2,60E+06
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	17.1.M	belo bež okrogla kolonija s svetlim robom	2,20E+06
	29.05.2015	aerobno, 37 °C	17.1.Z	bela okrogla kolonija	1,84E+06
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	15.2.S	bela okrogla pika	4,60E+07
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	17.2.M	bela okrogla kolonija	4,40E+05
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	17.2.S	drobna bela kolonija z prosojnim robom	5,90E+07
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	13.2.J	rumena okrogla kolonija s prosojnim robom	1,84E+08
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	14.2.Z	bela, prosojna malo nepravilna do okrogla kolonija	4,50E+05
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	14.2.M	belo prosojna nepravilna kolonija	5,40E+05
	29.05.2015	aerobno, 30 °C	14.2.J	bela kolonija s prosojnim robom	1,08E+08
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	18.1.S	rumena nepravilna kolonija z belim svetlečim robom	2,28E+08
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	18.1.M	velika vela kolonija oblike kot snežinka -1-	9,00E+05
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	18.1.M	bela (malo rumena) pika -2-	9,00E+05
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	19.1.M	rumeni skupki	8,00E+05
	3.06.2015	aerobno, 37 °C	19.1.S	bela s temnejšo notranjostjo, okrogla, malo razpacana kolonija	2,60E+10
	3.06.2015	aerobno,37 °C	22.1.J	rumena okrogla, malo razpacana kolonija	2,50E+08
	3.06.2015	aerobno,37 °C	22.1.Z	svetlo rumena kolonija, malo grudasta	1,50E+06
	3.06.2015	aerobno,37 °C	22.1.M	bela kolonija	8,90E+05
	3.06.2015	aerobno,30 °C	18.2.S	belo- prosojna okrogla kolonija	8,80E+07
	3.06.2015	aerobno,30 °C	19.2.M	bela do bež, okrogla kolonija	3,50E+05
	3.06.2015	aerobno,30 °C	22.2.M	delno okrogla bež kolonija	9,40E+05
	3.06.2015	aerobno,30 °C	22.2.J	okrogla drobna bež kolonija	1,05E+08

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
NB	20.06.2015	aerobno, 37 °C	24.1.J	rumena nepravilna razmazana kolonija	2,00E+08
	20.06.2015	aerobno, 37 °C	24.1.M	bela do svetlo rumena, delno okrogla kolonija	1,10E+06
	20.06.2015	aerobno, 37 °C	23.1.J	bela prosojna kolonija s tankim svetlim robom	1,14E+08
	20.06.2015	aerobno, 37 °C	23.1.Z	drobna bela pika	8,30E+07
	20.06.2015	aerobno, 37 °C	21.1.J	bela okrogla drobna pika	2,00E+08
	20.06.2015	aerobno, 37 °C	20.1.Z	rumena kolonija ki se nahaja v skupkih -1-	3,50E+07
	20.06.2015	aerobno, 37 °C	20.1.Z	bela okrogla, malo prosojna kolonija -2-	3,50E+07
	20.06.2015	aerobno, 37 °C	20.1.J	svetlo rumena, malo svetleča kolonija	1,39E+08
	20.06.2015	aerobno, 37 °C	20.1.M	bela okrogla kolonija	1,00E+06
	20.06.2015	aerobno, 30 °C	20.2.J	okrogla svetlo rumena kolonija s tankim prosojnim robom	7,40E+07
	20.06.2015	aerobno, 30 °C	20.2.Z	okrogla bela kolonija	1,04E+08
	20.06.2015	aerobno, 30 °C	21.2.Z	okrogla, temno bela kolonija	2,50E+06
	20.06.2015	aerobno, 30 °C	21.2.M	okrogla drobna kolonija, ki se nahaja v majhnih skupkih	7,20E+05
	20.06.2015	aerobno, 30 °C	23.2.Z	drobna pikčasta kolonija, malo svetleča	1,20E+06
	20.06.2015	aerobno, 30 °C	24.2.Z	okrogla bela kolonija	6,10E+07
	20.06.2015	aerobno, 30 °C	24.2.M	drobna bela kolonija	4,20E+05
	20.06.2015	aerobno, 30 °C	20.2.Z	svetlo rumena kolonija nepravilne oblike -2-	1,04E+08
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	12.1.J	rumena okrogla kolonija s prosojnim robom	8,90E+07
	8.07.2015	aerobno, 37 °C	27.1.J	rumena kolonija nepravilne oblike s svetlečim robom	4,90E+07
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	30.2.M	okrogla bela kolonija	1,42E+06
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	30.2.S	okrogla prosojno bela kolonija	1,12E+08
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	29.2.M	okrogla bela do svetlo rumena kolonija s prosojnim robom	9,90E+05
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	28.2.M	bela okrogla kolonija	6,80E+05
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	27.2.J	drobna bela okrogla kolonija	1,20E+08
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	27.2.Z	rumeno bela okrogla kolonija	7,30E+07
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	26.2.Z	bela nepravilna kolonija	4,30E+07
	9.07.2015	aerobno, 30 °C	12.2.J	bela kolonija s tankim prosojnim robom	7,30E+07

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
NB	13.07.2015	aerobno, 30 °C	27.2.M	svetlo rumeno bela okrogla kolonija	1,00E+06
	13.07.2015	aerobno, 30 °C	12.2.S	rumena okrogla kolonija	1,56E+08
	13.07.2015	aerobno, 30 °C	25.2.M	okrogla bela kolonija, ki se nahaja v drobnih pikicah	2,20E+06
	15.07.2015	aerobno, 37 °C	30.1.M	bela okrogla kolonija	2,50E+06
	15.07.2015	aerobno, 37 °C	29.1.Z	rumeni skupek	1,89E+08
	15.07.2015	aerobno, 37 °C	26.1.S	rumena kolonija, podobna rožici	6,50E+09
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.S	bela okrogla kolonija -1-	9,20E+09
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.S	bela okrogla kolonija -2-	2,12E+08
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.Z	rumena kolonija s tankim svetlim robom -1-	2,12E+08
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.Z	beli skupek -2-	9,10E+07
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.Z	rumeno rjavi skupek -1-	5,60E+07
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.Z	rumen skupek -2-	2,12E+08
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	27.3.J	rumeni naguban skupek	8,80E+05
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.Z	rumeno rjava okrogla kolonija	6,50E+07
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.M	bela kolonija nepravilne oblike	1,68E+08
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	25.3.J	bela okrogla kolonija	9,20E+09
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	26.3.J	rumena kolonija z malo nazobčanim svetlim robom	9,10E+07
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.S	drobna rumena nepravilna pikčasta kolonija	3,10E+09
	7.10.2015	aerobno, 37 °C	27.3.M	rumeni skupek	8,00E+05
7.10.2015	aerobno, 37 °C	29.3.J	bela rožičasta kolonija	7,00E+07	
EMERSON	15.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	1.1.S	bela, gladka, okrogla kolonija	1,50E+08
	15.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	3.1.S	svetlo rumena, nagubana kolonija	3,80E+07
	15.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	4.1.Z	drobna svetlo rumena kolonija	7,10E+05
	15.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	5.1.S	bela, okrogla kolonija	4,20E+07
	15.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	4.2.Z	velika rumena kolonija, malo izbočena -1-	3,60E+07
	15.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	4.2.Z	bela nagubana kolonija -2-	3,60E+07
	20.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	1.2.J	mala okrogla bela kolonija	4,80E+05

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
EMERSON	20.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	2.2.J	mala okrogla bela kolonija	5,30E+05
	20.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	5.2.Z	mala bela pika, kot grudica	4,20E+07
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	2.1.S	bela okrogla pika	2,40E+08
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	7.1.J	rumena velika kolonija, malo nazobčana	1,90E+06
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	7.1.M	rumena kolonija v skupkih	1,16E+06
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	7.1.Z	rumena kolonija v skupkih	4,60E+05
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	7.1.S	rumena, okrogla, gladka kolonija	7,20E+07
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	8.1.M	rumena, kepasta kolonija	1,40E+06
EMERSON	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	9.1.J	mala bela pikica	8,50E+07
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	7.2.M	bela okrogla kolonija	3,50E+05
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	7.2.Z	bela okrogla kolonija	1,06E+06
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	8.2.M	bela okrogla kolonija	1,50E+06
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	8.2.Z	bela okrogla kolonija	1,56E+06
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	9.2.S	okrogla bela pika	3,30E+09
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	9.2.M	okrogla bela pika, malo grudasta	4,10E+05
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	10.1.S	okrogla, rumena kolonija	1,44E+08
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	10.1.Z	okrogla bela kolonija	1,70E+06
	22.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	11.1.S	rumena kolonija v skupkih	5,60E+07
	25.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	11.1.J	drobna svetlo bela kolonija v skupkih	6,50E+05
	25.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	10.2.Z	bela majhna pika	8,00E+07
	25.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	11.2.J	rumena kolonija v skupkih	6,30E+05
	25.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	13.1.M	svetlo rumena drobcena kolonija v skupkih	1,76E+06
	25.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	14.1.Z	rumeno rjava kolonija v skupkih	5,00E+05
	25.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	14.1.S	velika svetlo rumena okrogla kolonija	1,18E+08
	27.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	15.1.M	rumena kolonija (malo v skupkih)	3,70E+05
	27.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	15.1.J	bela okrogla kolonija	8,60E+05
	27.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	16.1.Z	drobna rumena kolonija v skupkih	9,40E+05

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
EMERSON	29.05.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	16.1.M	rumena kolonija v skupkih	8,40E+05
	29.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	16.2.S	beli skupek	5,60E+07
	29.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	15.2.Z	bela drobcena kolonija	1,10E+08
	29.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	15.2.M	bela kolonija v skupkih	4,90E+05
	29.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	13.2.Z	bela okrogla kolonija	1,40E+06
	29.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	13.2.J	belo oranžni skupki	1,45E+08
	29.05.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	14.2.M	rumena, okrogla kolonija v majhnih skupkih	5,50E+05
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	18.1.J	skupek bele do svetlo rumene barve	5,20E+05
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	19.1.Z	svetlo rumena drobna pikica	2,50E+06
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	22.1.M	okrogla bela do bež kolonija	4,80E+05
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	22.1.S	svetlo rumeni - bež skupki	3,30E+07
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	18.2.J	okrogla bela kolonija	5,60E+05
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	18.2.S	svetlo rumena drobcena kolonija v skupkih	5,50E+07
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	19.2.J	okrogla bela kolonija	8,60E+05
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	19.2.Z	beli skupek	1,00E+06
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	19.2.M	živo rumena, okrogla kolonija	2,00E+06
	3.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	22.1.Z	okrogla bela pika	2,64E+06
	17.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	20.1.M	rumena kolonija v obliki rožice	4,80E+05
	17.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	24.1.S	svetlo rumen skupek	1,50E+08
	17.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	24.1.Z	rumeni skupek	3,70E+05
	17.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	21.1.S	svetlo rumena okrogla kolonija	1,50E+08
	19.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	21.2.M	rumena malo grudasta kolonija	1,16E+06
	19.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	21.2.Z	velika okrogla, svetlo bela do rumena kolonija	2,50E+06
	19.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	23.2.M	grudasta rumena kolonija	4,90E+05
	19.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	23.2.S	rumen skupek	2,00E+08
	19.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	24.2.Z	okrogla bela do rumena kolonija	1,50E+06
19.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	24.2.J	mala grudasta rumena kolonija	4,00E+05	

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
EMERSON	19.06.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	24.2.S	velika okrogla belo rumena kolonija	3,50E+07
	19.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	23.1.M	rumena, delno okrogla kolonija	9,60E+05
	19.06.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	24.1.M	rumeni skupek	4,50E+05
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	12.1.S	svetlo rumen skupek, malo izbočen	1,28E+08
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	12.1.Z	svetlo rumen skupek -1-	4,90E+07
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	12.1.Z	okrogla rumeno do rjava kolonija -2-	4,90E+07
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	25.1.S	svetlo belo do rumena kolonija, ki se nahaja v skupkih	6,70E+07
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	25.1.M	svetlo rumeni skupek	9,00E+05
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	26.1.J	drobna bela okrogla kolonija	8,00E+07
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	26.1.M	okrogla drobna svetlo rumena kolonija	2,40E+06
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	27.1.M	temno rumena okrogla kolonija -1-	2,16E+06
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	27.1.M	bela okrogla kolonija -2-	2,16E+06
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	28.1.Z	okrogla bela kolonija	2,50E+06
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	28.1.J	svetlo rumen svetleč skupek -1-	1,75E+08
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	28.1.J	mali skupek svetlo rumene barve -2-	1,75E+08
	8.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	28.1.M	velik bel skupek	8,20E+05
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	12.2.J	okrogla temno bela kolonija	1,20E+06
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	25.2.J	rumeni skupek	1,00E+06
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	25.2.M	svetel skupek	6,80E+05
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	26.2.M	bela okrogla kolonija	6,60E+05
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	26.2.S	rumeni skupek -1-	8,60E+07
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	26.2.S	prosojna okrogla kolonija -2-	8,60E+07
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	27.2.S	okrogla bela kolonija -1-	6,20E+07
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	27.2.S	okrogla rumena kolonija -2-	6,20E+07
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	28.2.J	beli skupek -1-	6,40E+05
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	28.2.J	rumena okrogla kolonija -2-	6,40E+05
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	29.2.Z	beli skupek	1,43E+06

GOJIŠČE	DATUM IZOLACIJE	POGOJI GOJENJA	VZOREC	OPIS KOLONIJ	CFU
EMERSON	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	29.2.S	prosojno bela kolonija -1-	6,60E+07
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	29.2.S	temno rumena okrogla kolonija -2-	6,60E+07
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	29.2.S	bela okrogla kolonija -3-	6,60E+07
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 30 °C	30.1.M	bela okrogla kolonija	6,00E+05
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	30.1.Z	okrogla prosojna kolonija -1-	1,42E+06
	9.07.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	30.1.Z	svetel skupek izbočene oblike -2-	1,42E+06
	9.10.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	25.3.J	okrogla svetlo rumena kolonija	2,50E+06
	9.10.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	27.3.M	okrogla belo rumena kolonija	1,22E+06
	9.10.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	27.3.S	svetlo rumena razpacana kolonija	1,88E+08
	9.10.2015	prepihano z N ₂ , 37 °C	27.3.Z	svetlo rumena razpacana kolonija	1,47E+06
GOJIŠČE IZ OVSENIH KOSMIČEV	1.06.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	3.2.J	svetlo rumena okrogla kolonija -1-	5,10E+07
	1.06.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	3.2.J	bela okrogla razpacana kolonija (kot rožica) -2-	5,10E+07
	1.06.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	3.2.J	svetla prosojna okrogla kolonija -3-	5,10E+07
	1.06.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	11.2.J	drobna bela okrogla kolonija -1-	3,10E+09
	1.06.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	11.2.J	drobna svetlo rumena kolonija -2-	3,10E+09
	28.08.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	16.2.S	okrogla bež kolonija	3,10E+07
	28.08.2015	prepihovanje z N ₂ , 37 °C	18.1.S	okrogla bela kolonija -1-	3,30E+07
	28.08.2015	prepihovanje z N ₂ , 37 °C	18.1.S	okrogla malo rumena kolonija -2-	3,30E+07
	28.08.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	21.2.S	pahljačasta prosojno bela kolonija	4,30E+07
	28.08.2015	prepihovanje z N ₂ , 37 °C	24.1.Z	okrogla svetlo rumena do bela kolonija	4,80E+05
	28.08.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	24.2.J	okrogla bela kolonija	4,10E+05
	28.08.2015	prepihovanje z N ₂ , 37 °C	29.1.S	prosojno bela kolonija	4,50E+05
	28.08.2015	prepihovanje z N ₂ , 30 °C	27.2.S	okrogla belo do prosojna kolonija	7,10E+07
	9.10.2015	prepihovanje z N ₂ , 37 °C	27.3.S	svetlo rumena razpacana kolonija (kot da izloča nekakšne pikice)	1,40E+08

PRILOGA II: Vprašalnik za prostovoljce

VPRAŠALNIK ZA PROSTOVOLJCE

Ime:

Priimek:

Starost:

Spol:

Kakšna bolezenska stanja/kronična bolezen:

1. Koliko obrokov ste pojedli in približno koliko tekočine ste spili pred drugim vzorčenjem?
2. Napišite kaj točno ste jedli in pili med prvim in drugim vzorčenjem?
3. Kaj pogosto jeste (pretežno rastlinsko hrano ali mesno ali mešano...), fermentirane produkte (probiotične jogurte, kefir, zelje...)
4. Kako ste se počutili na dan vzorčenja? (Slabo počutje, prehlad, glavobol...)
5. Katere pripomočke uporabljate za čiščenje zob? Kolikokrat na dan si umijete zobe? Katero pasto za umivanje zob uporabljate?
6. Ali imate pogosto neprijeten zadah v ustih?
7. Ali spite z odprtimi usti?
8. Kolikokrat na teden telovadite in kakšno obliko telovadbe izvajate (bolj aerobno ali bolj anaerobno)?
9. Kako pogosto žvečite žvečilni gumi in katere?
10. Ali imajo vaši starši (oz. vaši člani družine/gospodinjstva) zdrave zobe? Koliko zalivk imajo na zobeh?
11. Jemljete kakšna zdravila ali prehranske dodatke? Če da, napišite katere. Kdaj nazadnje ste jemali antibiotik?