MIKROORGANIZMI NA ZOBNIH ŠČETKAH

Raziskovalno področje:

Biologija

Raziskovalna naloga

Avtor: Tim Šinko

Mentorici: Urša Miklavčič, prof. Vesna Hojnik

Šola: II. gimnazija Maribor

MIKROORGANIZMI NA ZOBNIH ŠČETKAH

Raziskovalno področje:

Biologija

Raziskovalna naloga

Avtor: Tim Šinko

Mentorici: Urša Miklavčič, prof. Vesna Hojnik

Šola: II. gimnazija Maribor

Kazalo vsebine:

Kazalo vsebine: I

Kazalo slik: II

Kazalo tabel: III

Kazalo grafov: IV

Zahvala VI

Povzetek VII

Abstract VII

1 Uvod 1

1.1 Namen in cilji raziskovalne naloge 2

1.2 Raziskovalna vprašanja 2

1.3 Delovne hipoteze 3

2 Teoretično ozadje 3

2.1 Bakterije 3

2.2 Človeška ustna mikrobiota 4

2.3 Ustna mikrobiota tekom življenja 4

2.4 Mikroorganizmi na zobnih ščetkah 5

2.5 Protimikrobne učinkovine 6

2.6 Metoda ionizacije v nosilcu z lasersko desorbcijo in masnim analizatorjem časa preleta ionov 6

3 Materiali in metode dela 7

3.1 Materiali in oprema 7

3.2 Metode 8

3.2.1 Vzorčenje 8

3.2.2 Priprava gojitvenih plošč TSA in COH 8

3.2.3 Priprava bakterijske suspenzije 8

3.2.4 Priprava redčitvene vrste 9

3.2.5 Cepljenje bakterijske suspenzije 10

3.2.6 Štetje kolonij in cepljenje do posamezne vrste 10

3.2.7 Identifikacija z MALDI – TOF 11

3.2.8 Priprave na testiranje učinkovin 12

3.2.9 Izvedba antibiogramov 13

4 Rezultati 14

4.1 Izolacija bakterij z zobnih ščetk 14

4.1.1 Aerobne bakterije 14

4.1.2 Anaerobne bakterije 16

4.2 Identificirane bakterije 17

4.3 Opis identificiranih bakterij 18

4.4 Antibiogrami 22

5 Razprava 26

6 Družbena odgovornost 29

7 Viri in literature 29

Priloge 34

Kazalo slik:

Slika 1: Shematski prikaz poteka laboratorijskega dela raziskovalne naloge 9

Slika 2: Shematski prikaz redčitvene vrste (povzeto po: https://microbeonline.com/serial-dilution-method/) 10

Slika 3: Razmaz bakterijske kulture do posamezne kolonije na trdnem gojišču 11

Slika 4: Pripravljena plošča za analizo na sistemu MALDI – TOF 12

Slika 5: Rast na ploščah z razmazanimi suspenzijami (najvišje neredčeno, sredina 10x in najnižje 100x redčitev) zobnih ščetk na ploščah TSA (bele) in COH (rdeče) po 24 urni inkubaciji pri 37 ˚C v aerobnih pogojih. A) Z1 – nova zobna ščetka, B) Z2 (14-letnica, ščetka

v uporabi 6 mescev), C) Z3 (4-letnik, zobna ščetka v uporabi 1 leto), D) Z4 (49-letnica, zobna ščetka v uporabi 1 leto). 15
Slika 6: Negativna kontrola antibakterijskih učinkovin 22

Kazalo tabel:

Tabela 1: Ključ zobnih ščetk, pri katerem Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 ščetko 14-letnice uporabljano 6 mesecev, Z3 4-letnika uporabljano 1 leto in Z4 49-letnice uporabljano 1 leto.. 8
Tabela 2: Sestavine posameznih antibakterijskih učinkovin 12
Tabela 3: Povprečen CFU/ml na ploščo, pri kateri Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 ščetko 14-letnice uporabljano 6 mesecev, Z3 4-letnika uporabljano 1 leto in Z4 49-letnice uporabljano 1 leto 14
Tabela 4: Število kolonij na zobnih ščetkah zrastlih na ploščah COH in TSA po 5 dnevni inkubaciji pri 37 °C v anaerobnih pogojih in izpostavitvi etanolnemu šoki, pri kateri Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 ščetko 14-letnice uporabljano 6 mesecev, Z3 4-letnika uporabljano 1 leto in Z4 49-letnice uporabljano 1 leto. Precep predstavlja precepljeno bakterijsko kolonijo na novo ploščo, po tem ko smo po 5 dnevni inkubaciji pri temperaturi 37°C in anaerobnih pogojih zaznali rast. 16
Tabela 5: Vrste bakterij identificirane iz vzorcev zobnih ščetk z verjetnostjo identifikacije in številom čistih izolatov, ki so bili identificirani kot ista vrsta 17
Tabela 6: Opis identificiranih bakterij 18
Tabela 7 Priloga 1: Surovi podatki o identificiranih bakterijah z nekaterimi značilnostmi, pri čemer kratica Z1 pomeni bakterijo iz nove zobne ščetke, Z2 bakterijo iz ščetke 14-letnice, ki je bila v uporabi 6 mescev, Z3 bakterijo iz zobne ščetke 4-letnega dečka, ki je bila v uporabi 1 leto in Z4 bakterijo iz zobne ščetke 49-letnice, ki je bila v uporabi 1 leto 34
Tabela 8 Priloga 2: Surovi podatki o premeru inhibicijskih con, pri čemer je IC=premer inhibicijske cone [mm ± 1mm], X=povprečje premera, SN=starndardna napaka 35
Tabela 9: Priloga 3 število kolonij na zobni ščetki zrastli na ploščah TSA in COH po odvzemu brisa na aerobnih pogojih, pri čemer Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 zobno ščetko 14-letnice, katere ščetka je bila v uporabi 6 mescev, Z3 zobno ščetko 4-letnika, katerega ščetka je bila v uporabi 1 leto in Z4 zobno ščetko 49-letnice, katere ščetka je bila v uporabi 1 leto 36
Tabela 10: Priloga 4 CFU/ml na posameznem gojišču po nanosu prvih redčitev pri čemer Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 zobno ščetko 14-letnice, katere ščetka je bila v uporabi 6

mescev, Z3 zobno ščetko 4-letnika, katerega ščetka je bila v uporabi 1 leto in Z4 zobno ščetko 49-letnice, katere ščetka je bila v uporabi 1 leto..... 37

Kazalo grafov:

Graf 1: Povprečen premer cone inhibicije [mm] antibakterijske učinkovine **Meridol** na identificirane bakterije. Intervali na grafu predstavljajo standardno napako. 23

Graf 2: Povprečen premer cone inhibicije [mm] antibakterijske učinkovine **Colostrum os** na identificirane bakterije. Intervala na grafu predstavljajo standardno napako..... 24

Graf 3: Povprečen premer cone inhibicije [mm] **žajbljevega čaja koncentracije 0,25 g/ml** na identificirane bakterije. Interval na grafu predstavljajo standardno napako. 25

Seznam kratic in okrajšav:

MALDI – TOF – Metoda ionizacije v nosilcu z lasersko desorpcijo in masnim analizatorjem časa preleta ionov (*ang. matrix-assisted laser desorption/ionization with time of flight*)

ml – mililiter

RCF – relativna centrifugalna sila (*ang. relative centrifugal force*)

CFU/ml – kolonijsko število na mililiter (*ang. colony forming unit per mililiter*)

COH – gojišče z dodatkom konjske krvi

TSB – gojišče triptični soja bujon (*ang. Tryptone Soya Agar*)

µl – mikroliter

Zahvala

Zahvaljujem se šolski mentorici in zunanji mentorici za vso pomoč pri raziskovalni nalogi. Prav posebna zahvala gre Nacionalnemu laboratoriju za zdravje, okolje in hrano ter Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru, ki sta mi omogočili uporabi laboratorijske opreme za izvedbo praktičnega dela naloge. Hvala!

Povzetek

Ustna votlina je življenjski prostor več kot 700 različnim bakterijam. Zdravje ustne votline je ključnega pomena za ohranitev sistemskega zdravja v celotnem telesu, saj so usta začetek prebavnega trakta in hkrati povezava zunanjega okolja z notranjim. Zobne ščetke pripomorejo k ohranjanju zdrave ustne mikrobiote, saj z njimi iz zob dva-krat dnevno odstranjujemo bakterijske biofilme. V raziskavi nas je zanimalo, katere bakterije lahko najdemo na zobnih ščetkah posameznikov. To smo naredili z gojitvijo suspenzije z zobnih ščetk na gojiščih COH in TSA. Seve smo nato izolirali v čisti kulturi in jih identificirali z metodo MALDI – TOF. Preverili smo uspešnost zaustavitve rasti posameznih izoliranih bakterijskih vrst z ustnimi vodicami in nekaterimi naravnimi pripravki za izpiranje ust brez alkohola.

Ključne besede: bakterije, zobna ščetka, MALDI – TOF, ustne vodice, žajbelj

Abstract

The oral cavity is a habitat for more than 700 different bacteria. Oral health is crucial for maintaining systemic health throughout the body, as the mouth is the beginning of the digestive tract and the link between the external and internal environment. Toothbrushes help maintain a healthy oral microbiota by removing bacterial biofilms from the teeth twice a day. In this study, we wanted to know which bacteria can be found on people's toothbrushes. This was done by culturing the suspension from toothbrushes on COH and TSA media. The strains were then isolated in pure culture and identified by MALDI-TOF. We tested the success of stopping the growth of individual isolated bacterial species with mouthwashes and some natural, alcohol-free mouth rinses.

Key words: bacteria, toothbrush, MALDI – TOF, mouthwashes, sage

1 Uvod

Ustna votlina je eno najpomembnejših interakcijskih mest med človeškim telesom in zunanjim okoljem. Kot začetna točka prebavnega trakta je ključnega pomena za ohranjanje sistemskega zdravja (Priya Nimish, Revati, 2019). V človeški ustni votlini biva več kot 700 različnih vrst bakterij, poleg tega pa najdemo še veliko predstavnikov virusov in gliv. (Priya Nimish, Revati, 2019). Usta premorejo več ekoloških niš, saj lahko bakterije naseljujejo trdne površine zob ali mehka tkiva ustne sluznice. Mikroorganizmi, ki naseljujejo ustno votlino so lahko povezani s kroničnimi in rakavimi obolenji v telesu (Xian in sod., 2022). Prav tako so bakterije v ustih povzročiteljice paradontoze, kjer lahko skozi obzobna vnetna tkiva vstopijo v sistemski obtok in povzročajo okužbe po celotnem telesu. Na ustno mikrobioto vplivajo starost, oralno zdravje, pod katerega štejemo stanje zob, zgodovino bolezni (parodontozne bolezni, vnetja, karies...), prehrana in življenjsko okolje. Ljudje, ki sobivajo, si delijo velik delež ustne mikrobiote (Xian in sod., 2022). Obstajajo razlike med urbanim/ruralnim okoljem, kot med razvitimi državami in državami v razvoju (Priya Nimish, Revati, 2019). Največji vpliv na ustno mikrobioto odraslih ljudi imajo higienske navade, medtem ko ima pri mladostnikih velik vpliv tudi spol in teža (Xian in sod., 2022).

Redna ustna higiena, ki vključuje uporabo nitke, ščetkanje zob in čiščenje jezika lahko zmanjša številčnost taksomov, povezanih s patogenimi stanji, ki so potencialno škodljivi za posameznika (Zachary in sod., 2020). Ustna mikorbiota je različna med posamezniki, vendar so določeni rodovi, ki so prisotni pri veliki večini ljudi – le ti ne povzročajo patogenih stanj in delujejo simbiontsko. To so rodovi *Streptococcus, Veillonella, Neisseria* (Xian in sod., 2022).

Za čiščenje ustne votline v Sloveniji v večini primerov uporabljamo zobne ščetke, vendar redko kdo posveča pozornost kaj se na njih v resnici nahaja. Že po prvi uporabi so zobne ščetke lahko obremenjene z najrazličnejšimi vrstami bakterij in drugih mikroorganizmov. Mikroorganizmi lahko na zobne ščetke pridejo iz ust ali iz okolja v katerem jih shranjujemo (skupaj z ostalimi družinskimi člani, v bližini drugih pripomočkov za osebno nego, toalete...). Dokazali so, da lahko na samo eni zobni ščetki najdemo do 1,2 miljona bakterij (Univerza Arkansas za medicinske vede, 2019). S ščetko te bakterije prenesemo v usta in nato tudi nižje v črevesje. Zato je potrebno skrbeti za higieno in redno menjavo zobnih ščetk, te bi morali menjati, ko so ščetine obrabljene oz. najkasneje na 3-4 mesece (Xian in sod., 2022; Zachary, 2020).

Zaradi vse več znanja o obremenitvi zobnih ščetk z mikroorganizmi so raziskovalci poskušali najti načine za efektivno odstranitev bakterij s ščetk. Ugotovili so, da zobna pasta v kombinaciji

z ustnimi antiseptiki opazno zmanjša mikrobno obremenjenost zobnih ščetk (Bunetel in sod., 2000). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi z ustno vodico Listerine, ki vsebuje alkohol (etanol). Zmanjšala je bakterijsko obremenitev zobne ščetke že po 20 minutah namakanja zobne ščetke v raztopini Listerine (Caudry in sod., 1995). V študiji, kjer so zobne ščetke zgolj spirali pod tekočo vodo ni bilo zaznanega opaznega zmanjšanja mikrobne obremenitve zobne ščetke ali preprečitve tvorbe biofilmov (Sato in sod., 2005). Pomemben je tudi prostor shranjevanja zobne ščetke, ko govorimo o obremenjenosti z mikroorganizmi. Zobne ščetke, shranjene v zaprtih škatlah so bolj obremenjene z mikroorganizmi kot tiste shranjene na zraku (Dayoub in sod., 1977). Že samo pokrovček za zobno ščetko poveča stopnjo obremenitve z bakterijami, saj jim nudi primernejše okolje za njihovo rast (Abhishek in sod., 2007).

1.1 Namen in cilji raziskovalne naloge

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti katere mikroorganizme lahko najdemo na rabljenih in novih zobnih ščetkah, ter preveriti ali se te ujemajo z mikroorganizmi identificiranimi v sorodnih raziskavah. Nadalje na čistih kulturah izoliranih bakterij preveriti učinkovanje ustnih vodic in naravnih „protimikrobnih“ sredstev (žajbelj, olje za izpiranje ust).

Poskušali smo najti tudi sporogene anaerobne bakterije, saj imajo le te zmožnost preživetja v anaerobnem okolju črevesja.

Cilj raziskave je preučiti katere bakterije se zadržujejo na zobnih ščetkah uporabnikov in kako jih lahko odstranimo s pomočjo ustnih vodic in drugih pripravkov brez alkohola (olja za izpiranje ust, žajbelj), ter informirati ljudi, kako se lahko uspešno izognemo nekaterim težavam že samo s higieno zobne ščetke.

1.2 Raziskovalna vprašanja

R1: Ali bomo na izbranih zobnih ščetkah našli bakterije iz človeške ustne mikrobiote, identificirane tudi v drugih raziskavah?

R2: Ali je zobna ščetka, ki je v uporabi dlje časa bolj bakterijsko obremenjena (tudi z anaerobnimi bakterijami) kot zobna ščetka, ki je bila v uporabi krajši čas in ali bomo na zobnih ščetkah našli tudi anaerobne bakterije?

R3: Ali so nove zobne ščetke in protibakterijske učinkovine pred uporabo sterilne?

R4: Katera izmed učinkovin bo imela protibakterijski vpliv na največje število bakterijskih vrst izoliranih iz zobnih ščetk?

1.3 Delovne hipoteze

H1: Z gojenjem bakterij iz izbranih zobnih ščetk bomo z metodo MALDI-TOF identificirali najpogosteje prisotne bakterije človeške ustne mikrobiote, ki so bile identificirane tudi v drugih raziskavah.

H2: Zobna ščetka, ki je v uporabi dlje časa bo bolj bakterijsko obremenjena tudi z anaerobnimi bakterijami.

H3: Neuporabljena zobna ščetka, kupljena v živilski trgovini, in protibakterijske učinkovine bodo sterilne.

H4: Protibakterijske učinkovine brez alkoholov bodo prav tako zavrle rast bakterij izoliranih iz zobnih ščetk.

2 Teoretično ozadje

2.1 Bakterije

Bakterije so vse prisotni enocelični organizmi, ki naseljujejo najrazličnejše habitate, vse od vročih vrelcev, radioaktivnih odpadkov in globokih biosfer, zmožne so rasti v prisotnosti ali odsotnosti kisika. Za pridobivanje energije bakterije živijo v simbiotskih, komenzalnih ali parazitskih odnosih z gostiteljem. Bakterije so lahko najrazličnejših oblik; kroglaste (koke), paličaste (bacile), ukrivljene palice (vibrie) in spiralne (spirile) (Koce, Zalar, Belušič, Vittori, Turk, 2018). Določene bakterijske vrste se povezujejo in tvorijo značilne strukture, kot so bakterije, ki se povezujejo v pare (npr. rod Neisserie), verige (streptokoki), grozdi (stafilokoki), lahko pa tvorijo tudi biofilme, s katerimi se pritrdijo na površine. Biofilmi so goste populacije v katerih so bakterije odpornejše na antibiotike in antiseptike. Antibiotiki onemogočajo določene presnovne procese v bakterijski celici, to lastnost ljudje uporabljamo v boju proti nezaželenim vrstam (Kadner, 2023).

Glede na sestavo celične stene ločimo dva tipa bakterij; po gramu pozitivne in negativne. Gram pozitivne bakterije imajo debelo celično steno, v nasprotju z njimi imajo gram negativne bakterije razmeroma tanko celično steno (Koce, Zalar, Belušič, Vittori, Turk, 2018). Te razlike v zgradbi povzročijo različno občutljivost na različne antibiotike, ki preprečujejo izgradnjo delov celične stene.

Nekateri rodovi gram pozitivnih bakterij, kot so *Bacillus, Clostridium, Sporohalobacter, Anaerobacter* in *Heliobacterium* lahko tvorijo zelo odporne, mirujoče strukture, imenovane

endospore. Vsaka endospora je obdana s plastmi korteksa plašča, sestavljena iz peptidoglikana in različnih proteinov. Endospore niso metabolno aktivne in lahko preživijo ekstremne razmere, kot so obsevanje z UV svetlobo, gama sevanja, detergente, razkužila, ekstremne temperature in tlak, visoko vlažnost ipd. (Kadner, 2023). Bakterije, ki so sposobne preživeti anaerobne pogoje ob tvorbi spor, so sposobne preživeti kislo okolje želodca in naseljujejo človeško črevesje (Kadner, 2023).

2.2 Človeška ustna mikrobiota

Ustna mikrobiota je v zadnjem času vedno bolj pogosta tema raziskovanja. Disbiotična združba ustnih bakterij lahko povzroča karies, ki napada zobe in paradontozo, ki napada dlesni. (Lu in sod., 2019). Disbioza je posledica pomanjkljive ustne higiene, ki pa v daljših obdobjih lahko vodi v sistemske bolezni.

Bakterije so najbolj raziskani mikroorganizmi ustne mikrobiote. Med pogostejše predstavnike prištevamo *Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis, Staphylococcuse, Bacillus* in *Lactobacillus* (Lu in sod., 2023). Nekateri sevi bakterij iz rodu *Streptococcus* so sposobni tvorbe biofilmov z oportunistično glivo *Candida*. *Candida* je nevtralna, kadar je naša ustna mikrobiota zdrava, vendar ob disbiozi dobi priložnost za napad mehkega tkiva ust (Lu in sod., 2023).

Obstaja povezava med ustno in črevesno mikrobioto (Smiles by Shields, 2022). Bakterije v nižje dele prebavnega trakta prihajajo normalno s požiranjem ali preko krvnega sistema ob parodontalni bolezni, kot posledica močnega vnetnega odziva in večje prepustnosti žil. Če so to nezaželene bakterije, in se v črevesju namnožijo lahko sprožijo imunski odziv telesa, ki mnogokrat privede do vnetja (Smiles by Shields, 2022).

K zdravi ustni mikrobioti pripomore predvsem čiščenje zob. Povprečen čas nastanka zobnih oblog je med 12 in 24 ur, zato je priporočljivo ščetkanje dvakrat dnevno, priporočljivo je tudi izpiranje ust z antiseptičnimi vodicami. Najboljša preventiva pred parodontalnimi boleznimi so redni obiski zobozdravnika, ki bo prepoznal zgodnje znake in jih zdravil preden se razvije kronično stanje (Smiles by Shields, 2022).

2.3 Ustna mikrobiota tekom življenja

Otroška usta so pred rojstvom sterilno okolje. Do prve poselitve z bakterijami pride ob rojstvu, prvem stiku s starši in začetkom prehranjevanja (Sulyanto in sod., 2019). Po porodu otrokovo ustno votlino najpogosteje poselijo aerobne bakterije iz rodu *Streptococcus, Staphilococcus* ter

bakterij rodu *Lactobacillus*. Do pridobitve bakterij v usta bi naj prišlo v prvih urah po rojstvu (Dragaš, 1996; Sulyanto in sod., 2019). Do razvoja stalnih zob ustno votlino naselijo tudi bakterije, prilagojene na rast na površini zoba in v parodontalnih žepih (Dragaš, 1996).

Z vpeljavo trdne hrane v otrokovo prehrano se spremeni tudi ustna mikrobiota. Te bakterije so še vedno večino aerobne. S koncem pubertete in z izrastom stalnih zob ter poglabljanjem gingvalnih žepov se ustvari ustrezno okolje tudi za anaerobne bakterije. Vrste bakterij, ki poselijo ustno votlino po koncu pubertete se tekom življenja vse do izgube zob ne spreminjajo, v ustih se vzpostavi ravnovesje. Do porušenja pride ob jemanju antibiotikov (Dragaš, 1996).

Mikrobiota odraslega človeka se od otrokove in starostnikove razlikuje po večji pestrosti aerobnih in anaerobnih bakterij, celo gliv pri odraslih ljudeh. Najpogosteje zastopane vrste pred stalnimi zobmi so predvsem *Streptococcus*, *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Lavtobacillus* spp., *Leptotrichia buccalis*, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., kasneje pa tudi vrste *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Rothia* in *Capnocytophaga*. Ustna mikrobiota starostnikov, ki so zobe že izgubili oz. so jih zamenjali z zobno protezo, je podobna dojenčkovi, saj so brezzoba usta neprimerna površina za rast anaerobov (Podržaj, S., 2011).

V svetu moderne medicine v boju proti bakterijskim okužbam uporabimo antibiotike, pri uporabi katerih ne smemo pozabiti, da lahko ubijejo tudi koristne, simbiotske bakterije, ki naseljujejo ustno votlino in ostale dele prebavnega trakta. Iz teh vidikov je preventivna skrb za ustno mikrobioto in s tem povezano preprečevanje okužb bistvenega pomena pri preprečevanju nadaljnjih zapletov (Lapanje, 2019; Dragaš, 1996)

2.4 Mikroorganizmi na zobnih ščetkah

Na zobnih ščetkah se lahko nahaja tudi več milijonov bakterij, ki med ščetkanjem pridejo v ustno votlino (Lee, 2019). Bakterijske celice so sposobne preživeti na ščetinah zobnih ščetk in se lahko, ob nepravilni hrambi, prosto prenašajo med zobnimi ščletkami članov enakega gospodinjstva (Lee, 2019). Na spletu lahko zasledimo mnogo nasvetov kako „očistiti“ zobno ščetko (Bunetel L., in sod., 2000; Caudry S., in sod., 1995; Sato S., in sod., 2005). Ne glede na izbrano sredstvo (ustne vodice, razkužila, umivanje in sušenje ščetke itd.) mikrobov ne bomo odstranili v celoti. Najučinkovitejša metoda zaščite pred nezaželjenimi bakterijami je tako menjava zobne ščetke, saj bi le te morale biti sterilne. Raziskovalci so ugotovili, da so na ščetkah shranjenih v kopalnici v največji meri prisotni predstavniki rodu *Streptococcus* (19,73%), *Pseudomonas* (16,08%), *Enterococcus* (8,16%), in *Neisseria* (7,04%). Medtem ko

so na ščetkah, ki so jih shranjevali izven kopalnice našli predstavnike rodu *Enterococcus* (30,76%), *Pseudomonas* (21,85%), *Streptococcus* (14,94%), in *Lactobacillus* (5,15%) (Lee, Lee, 2019).

Raziskava, ki je dokazovala korelacijo med močjo kontaminacije in mestom shranjevanja ter časom uporabe je dokazala, da so zobne ščetke, ki so v uporabi 3 mesce močneje kontaminirane od tistih v uporabi en mesec. Prav tako so bile ščetke, ki so shranjene skupaj z ostalimi družinskimi člani močneje kontaminirane kot tiste, ki so bile hranjene samostojno, saj se lahko bakterije ob dotiku med zobnimi ščetkami prenašajo (Yeon, Young , 2019; Raiyani, 2015).

2.5 Protimikrobne učinkovine

Bakterije se v ustih pogosto pojavljajo v obliki biofilmov, ki začnejo vplivati na celoten sistem, saj so v takšni obliki mnogo bolj odporne proti delovanju antibiotikov in drugih protimikrobnih sredstev vključno z vodicami in raztopinami za izpiranje ust. Torej je lahko ščetkanje, ki prepreči povezovanje bakterij v biofilme prvi korak k izboljšanju ustne higiene in posledično sistemskega zdravja celotnega organizma.

Večina bakterij je pred tvorbo biofilma veliko bolj dovzetna za protimikrobni učinek ustnih vodic in raztopin za spiranje ust, kot po tvorbi biofilma (Masadeh in sod, 2015). Ugotavljali so tudi katera učinkovina, ki deluje v boju proti izbranim bakterijam je ključna za njihovo učinkovitost. Najbolj učinkovita sredstva so vsebovala kloroheksidin glukonat ali cetilpiridinijev klorid v zobnih pastah oziroma ustne vodice na alkoholni bazi (Caudry in sod., 1995; Abhishek in sod, 2007; Efstratiou in sod, 2007).

2.6 Metoda ionizacije v nosilcu z lasersko desorbcijo in masnim analizatorjem časa preleta ionov

MALDI – TOF[1] (*ang. matrix-assisted laser desorption/ionization with time of flight*) je metoda s pomočjo katere v sorazmerno kratkem času identificiramo izolate. Na označena mesta nanesemo vzorec čistega bakterijskega izolata in dodamo 1 µl 70% mravljične kisline, ki razkroji celično steno in izpostavi beljakovine. Ko se ta posuši dodamo še 1 µl MALDI matriksa, ki poskrbi, da se beljakovine vežejo nanj in ob evaporaciji omogoči identifikacijo bakterije. Nato ploščico vstavimo v napravo se vzpostavi potreben tlak, nato vsak vzorec večkrat zadane laser, ki zaradi visoke temperature sproži evaporacijo vzorcev v vakum. Le to

[1] Metoda ionizacije v nosilcu z lasersko desorbcijo in masnim analizatorjem časa preleta ionov

je sklopljeno z merilcem časa preleta proteina do senzorja. Molekule z večjo molekulsko maso bodo za to pot potrebovale nekoliko več časa kot lažje. Vsaka molekula tako predstavlja specifičen čas na grafu. Kombinacija laserske ionizacije in merjenja časa leta (pot, ki jo prepotuje evaporiran vzorec od ploščice do senzorja) omogoča primerjavo zastopanosti proteinov v določenem izolatu z vsemi v bazi podatkov. Tako dobimo v izjemno kratkem času ime bakterije vključno z verjetnostjo določitve, kjer vrednosti med 2,00 in 3,00 predstavljajo visoko zanesljivost identifikacije, 1,70 – 1,99 srednjo zanesljivost identifikacije, tisti organizmi kjer pa je interval identifikacije med 0,00 in 1,69 niso identificirani, saj jih sistem ne prepozna.

3 Materiali in metode dela

3.1 Materiali in oprema

- rokavice
- laboratorijska halja
- cepilna zanka
- 15 ml centrifugirke
- 1,5 ml epice
- razmazovalna palčka (hokejka)
- petrijevke
- gojišče COH
- gojišče TSB
- NaCl
- agar
- laminarij
- avtoklav
- epruvete
- centrifuga (Eppendorf)
- analizna tehtnica
- vortex
- Densimat (Biomerieux)
- Retro C80 (naprava, ki je vrtela gojitvene plošče)
- gorilnik
- parafilm
- MALDI matriks

- 70% mravljična kislina
- MALDI – TOF MS (Bruker, Billrtica, ZDA)
- pipeta (P10, P100 in P1000 µl) (Eppendorf)

3.2 Metode

3.2.1 Vzorčenje

Vzeli smo zobne ščetke treh uporabnikov (otroka, najstnika in odrasle osebe) ter jih sterilno shranili. Kupili smo novo zobno ščetko, da bi preverili ali so neuporabljene zobne ščetke sterilne.

Tabela 1: Ključ zobnih ščetk, pri katerem Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 ščetko 14-letnice uporabljano 6 mesecev, Z3 4-letnika uporabljano 1 leto in Z4 49-letnice uporabljano 1 leto

Zobna ščetka	**Uporabnik**	**Čas uporabe**
Z1	Nova zobna ščetka	Ni v uporabi
Z2	14-letnica	6 mesecev
Z3	4-letnik	1 leto
Z4	49-letnica	1 leto

3.2.2 Priprava gojitvenih plošč TSA in COH

Pripravili smo trdno gojišče TSA (*ang. tryptic soy agar*). V 1 l destilirane vode smo zatehtali 30 g TSB in 15 g agarja. Gojišče in agar smo raztopili v vodi. Avtoklavirali smo 30 minut pri 121 °C in 1 bar tlaka. Gojišče smo nato razlili v sterilne petrijevke. Druge plošče na katerih smo cepili bakterije so bile kupljene plošče z gojiščem COH.

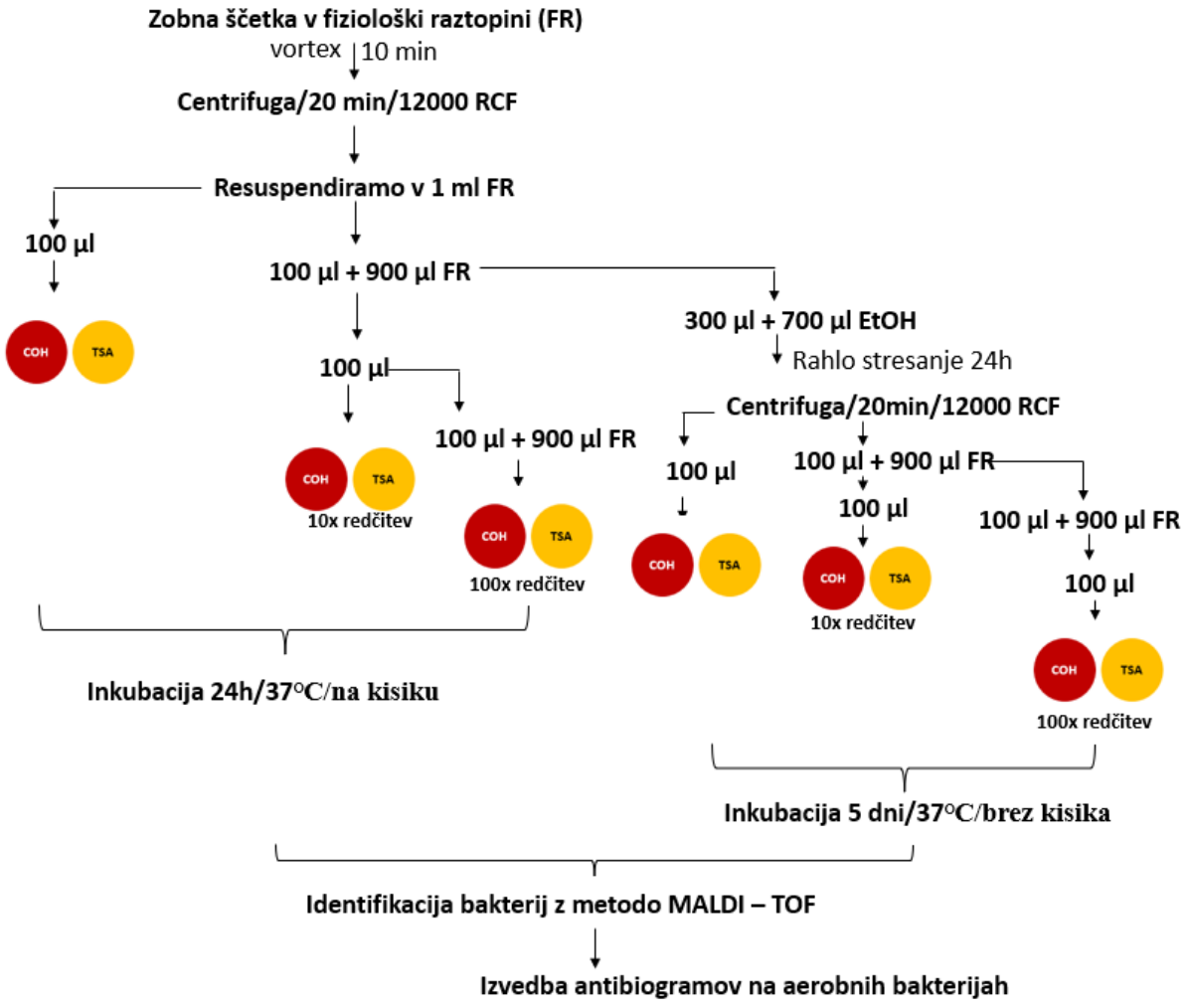
Bakterije smo gojili na dveh različnih ploščah z namenom, da bi izolirali čim več različnih bakterijskih vrst, kar dosežemo z različnimi pogoji za rast.

3.2.3 Priprava bakterijske suspenzije

V sterilnih pogojih smo ščetke dali v sterilne centrifugirke in jih prelili s sterilno fiziološko raztopino, tako da je bila v raztopino namočena cela glava ščetke. Centrifugirke smo zaprli s parafilmom, in jih 10 minut vortexirali z namenom, da bi v fiziološko raztopino iz ščetke resuspendirali čim več bakterij. Zobno ščetko smo odstranili iz fiziološke raztopine in vzorce centrifugirali 20 minut na sobni temperaturi in 10 000 obratih na minuto (12 000 RCF). Iz

centrifugirke smo s pipeto odpipetirali vso tekočino, tako da je v centrifugirki ostal zgolj pelet. Peletu smo dodali 1 ml fiziološke raztopine in resuspendirali bakterije.

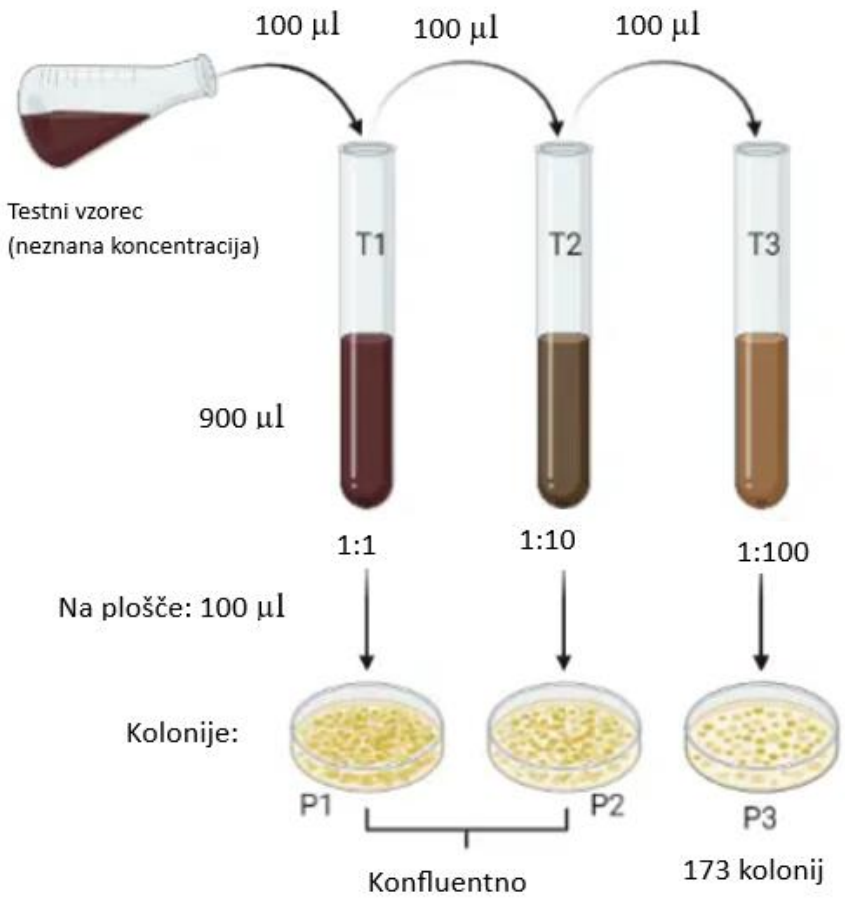
Del suspenzije smo šokirali z etanolom. V 300 µl bakterijske suspenzije smo dodali 700 µl 100% etanola in inkubirali 24 ur pri temperaturi 23 °C in rahlem stresanju. Naslednji dan smo suspenzijo centrifugirali 20 minut pri 10 000 obratih na minuto. Supernatant smo odstranili in pelet resuspendirali v 1 ml fiziološke raztopine.



Slika 1: Shematski prikaz poteka laboratorijskega dela raziskovalne naloge

3.2.4 Priprava redčitvene vrste

Pripravili smo 1,5 ml epice za pripravo redčitvenih vrst. Suspenzije celic smo redčili v redčitveni vrsti do 10x in 100x redčive, tako, da smo odvzeli 100 µl prvotne suspenzije in jo dodali v 900 µl fiziološke raztopine, premešali s pipetiranjem. Tej 10x redčitvi smo odvzeli 100 µl in dodali v 900 µl fiziološke raztopine, da je nastala 100x redčitev prve suspenzije bakterij (Slika 1).



Slika 2: Shematski prikaz redčitvene vrste (povzeto po: https://microbeonline.com/serial-dilution-method/)

3.2.5 Cepljenje bakterijske suspenzije

100 µl vsake redčitve suspenzije smo odpipetirali na označene plošče z gojiščema TSA ali COH in jih s sterilno razmazovalno palčko (hokejko) razmazali po celotni površini plošče. Plošče, na katere smo nanesli ne-šokirano bakterijsko suspenzijo, smo inkubirali aerobno pri temperaturi 37 °C 24 ur. Plošče, na katere smo nacepili bakterijske suspenzije po etanolnem šoku, smo inkubirali anaerobno pri 37 °C 5 dni.

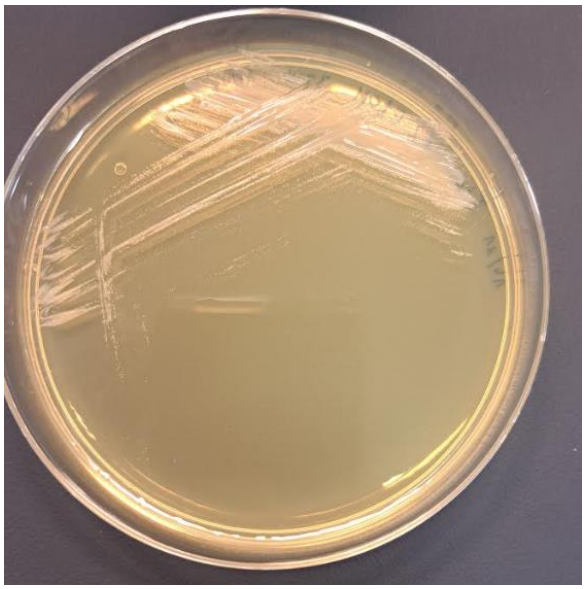
3.2.6 Štetje kolonij in cepljenje do posamezne vrste

Po 24 urah oziroma 5 dneh za plošče v anaerobnih pogojiih, smo plošče vzeli iz inkubatorja in na vsaki prešteli število vidnih kolonij in si zapisali morebitne komentarje na rezultat. Vsaka plošča je bila označena z imenom plošče, datumom cepitve bakterij ter pogoji gojenja. Če je imela plošča več kot 300 kolonij pomeni, da je bila konfluentno prerasla in smo poskušali s precepljanji priti do čiste kulture. Število kolonij na posamezni plošči, ki ni bila konfluentno prerastla smo zapisali in izračunali povprečno število kolonij na mililiter na posamezno redčitev na posameznem gojišču (Enačba 1).

CFU/ml smo izračunali po spodnji enačbi:

$$\frac{CFU}{ml} = \frac{\text{število kolonij na plošči} \times \text{redčitev}}{\text{volumen osnovne suspenzije nanešene na gojišče}} \tag{1}$$

Cepljenje je potekalo tako, da smo iz konfluentno prerastlega vzorca s cepilno zanko odvzeli vzorec bakterij in jih razmazali na čisto TSA ploščo. Tako smo dosegli, da je na plošči zrastlo manj kolonij bakterij. Ko smo lahko iz plošče odvzeli natanko eno kolonijo smo to kolonijo razmazali na novo ploščo. Iz plošče smo odvzeli toliko kolonij kolikor jih je bilo na pogled različnih. Precepljanje je trajalo toliko časa, dokler si kolonije na isti plošči niso bile tako podobne, da smo sklepali, da gre za kolonijo iste vrste bakterije (Slika 3).



Slika 3: Razmaz bakterijske kulture do posamezne kolonije na trdnem gojišču

3.2.7 Identifikacija z MALDI – TOF

Ko smo imeli bakterijske seve v čisti kulturi, smo iz plošče s sterilno cepilno zanko zajeli posamezno kolonijo in jo razmazali na MALDI ploščico (Slika 4). Bakterije so morale biti v namen identifikacije „sveže“, kar pomeni, da smo jih precepili 24 ur pred identifikacijo. Na označena mesta smo nanesli vzorec posamezne kolonije in dodali 1 µl 70% mravljične kisline, ki razkroji celično steno in izpostavi beljakovine. Ko se je ta posušila smo dodali še 1 µl MALDI matriksa, ki poskrbi, da se beljakovine vežejo nanj in ob evaporaciji omogoči identifikacijo bakterije. Ko se je tarčna plošča posušila, smo jo vstavili v aparat in s pomočjo programske opreme identificirali izolate.

Slika 4: Pripravljena plošča za analizo na sistemu MALDI – TOF

3.2.8 Priprave na testiranje učinkovin

Vse identificirane bakterije so zmožne rasti na gojišču TSA, zato smo v nadaljevanju uporabljali to gojišče. Ploščo smo razdelili na šestine, saj je bilo testiranih učinkovin skupno šest. Pred začetkom testiranja smo preverili dekleracijo učinkovin (Tabela 2), da smo se prepričali, da ne vsebujejo alkoholov, ki bi sami po sebi povzročili inhibicijo ter jih ustrezno označili. Vse učinkovine, razen učinkovine Meridol, niso vsebovale alkoholov, ki bi imeli dokazanj inhibitorni učinek. Meridol je tako predstavljal kontrolo alkoholnih ustnih vodic. Testirali smo vseh 21 različnih vrst bakterij, ki smo jih predhodno identificirali. Bakterije smo 24 ur pred začetkom testiranja ponovno precepili na TSA plošče in jih gojili 24 ur na 37 °C.

Tabela 2: Sestavine posameznih antibakterijskih učinkovin

Učinkovina	**Sestavine**
Učinkovina 1: olje za izpiranje ust Alverde, proizvajalca Naturkosmetik	Olje hibrida *Helianthusa Annuusa*, olje plodov *Olea Europaea*, olje sezamovih semen, olje listov *Menthe Arvensis*, arome limone
Učinkovina 2: ustna vodica Meridol, proizvajalca Mouthrinse	Voda, Xylitol (sladkorni alkohol – kontrola alkoholnih ustnih vodic), PVP (polimer, ki se v farmaciji pogosto uporablja kot vezivno sredstvo ob oralni uporabi, saj omogoča lahko prehajanje skozi telo), peg-40 hidrogenirano ricinusovo olje, olaflur,

	kositrov fluorid, natrijev saharin in Cl 42051, ki se v Evropi uporablja kot modro barvilo
Učinkovina 3: ustna vodica proizvajalca Solime Colostrum os, proizvajalca Remargin	Voda, sok listov aloe *barbadensis*, kolostrum, olje lupine citrusov limone, sadno olje *Pimpinella Anisum*, glicerin, izvleček semen *Citrus Grandis*, olje brstov *Eugenia Caryophyllus*, citronsko kislino, kalijev sorbat, olje listov *Melaleuca Viridiflora*, olje *Thymus Vulgaris*, citral, evgenol (ki se predvsem v zobozdravstvu precej uporablja kot lokalni antiseptik)
Učinkovina 4: olje za izpiranje ust Terra Naturi – veganski produkt, proizvajalca Naturkosmetik	Različna olja (Helianthus annuus, plodovi olea europaea, sezamova semena, menta piperita) in tocopherola (tip vitamina E znanega pod oznako E307), ter limoninega ekstrata
Učinkovina 5: žajbljev čaj	Koncentracija 0,25 g/ml
Učinkovina 6: žajbljev čaj	Koncentracija 0,01 g/ml

3.2.9 Izvedba antibiogramov

Količino celic smo izmerili s pomočjo naprave Densimat in je morala znašati natanko 0,5 McF (McFarland standard). V fiziološko raztopino smo s palčko za jemanje brisov dodali toliko bakterij iz plošče, da smo dosegli spremembo prosojnosti, ki ustreza 0,5 McF kar korelira z 10^8 CFU/ml. Nato smo s pomočjo naprave, ki je vrtela gojitveno ploščo bakterije enakomerno konfulentno nanesli na ploščo. Na označena mesta smo odpipetirali 10 µl ustrezne učinkovine. Plošče smo inkubirali pri 37 °C 24 ur pri aerobnih pogojih. Naslednji dan smo z ravnilom odmerili premer inhibicijske cone, ki jo je ustvarila posamezna učinkovina. Za kontrolo smo učinkovine, katerih vpliv na izbrane bakterije smo preučevali, nanesli tudi na ploščo brez bakterij in potrdili sterilnost testirane učinkovine. Testirali smo antiseptične vodice ter olja za izpiranje ust. Preizkusili smo tudi žajbelj, ki bi naj bi pomagal pri vnetjih. Žajbljev čaj smo skuhali, tako da smo 50 g žajblja dodali v 200 ml destilirane vode (0,25 g/ml destilirane vode) in manjšo koncentracijo čaja z 1,5 g žajblja v 150 ml (0,01 g/ml destilirane vode) vrele destilirane vode in namakali 12 ur. Čaj smo nato filtrirali skozi sterilen filter s porami v

velikosti 0,2 µm. Avtoklaviranje ni bilo potrebno, saj je velikost bakterij večja kot so pore filtrirnega papirja.

4 Rezultati

4.1 Izolacija bakterij z zobnih ščetk

Z zobne ščetke Z1 nismo uspeli izolirati nobene kolonije, razen na plošči Z1 COH 100x redčitev, kar je najverjetneje posledica kontaminacije (Slika 5A). Ta zobna ščetka je bila sterilna. Največje število bakterij smo zaznali na zobni ščetki Z2, saj so bile vse plošče konfulentno prerastle, tudi pri največji redčitvi (100x). To pomeni, da števila kolonij niti ni bilo mogoče prešteti (Slika 5B). Z zobne ščetke Z3 smo našli 2 koloniji (Slika 5C) in z zobne ščetke Z4 346 kolonij (Slika 5D).

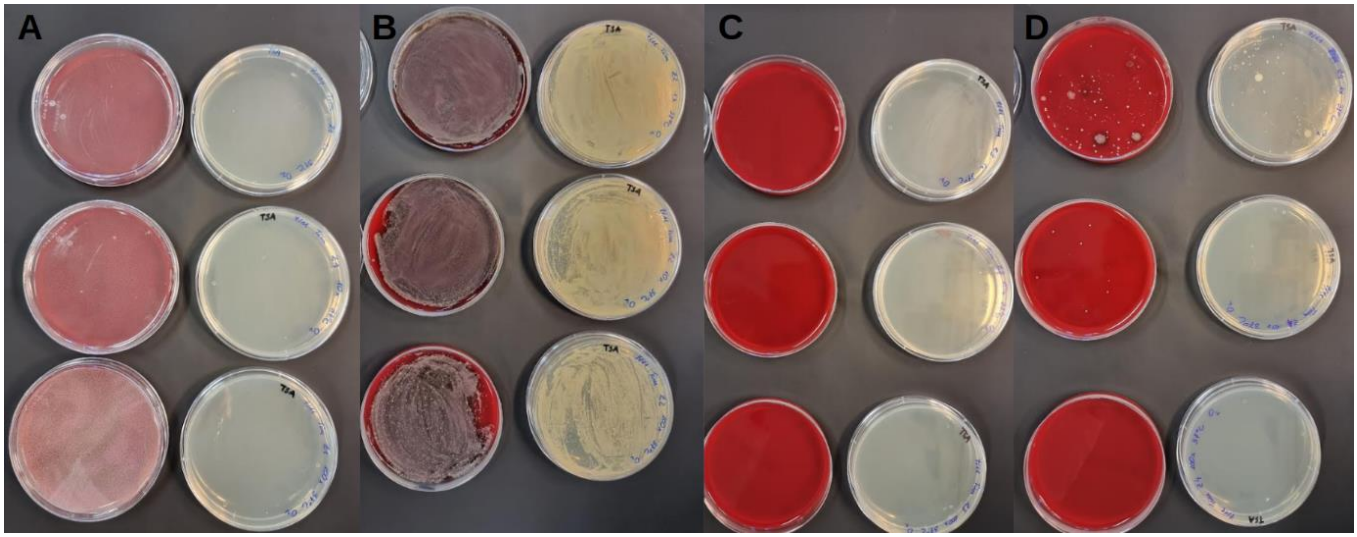
Ko smo prešteli vse kolonije na različnih ploščah z različnimi redčitvami smo izračunali povprečno število kolonij posamezne zobne ščetke na posameznem gojišču upoštevajoč redčitveno vrsto (Tabela 3 in 4).

4.1.1 Aerobne bakterije

Tabela 3: Povprečen CFU/ml na ploščo, pri kateri Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 ščetko 14-letnice uporabljano 6 mesecev, Z3 4-letnika uporabljano 1 leto in Z4 49-letnice uporabljano 1 leto

Zobna ščetka	Gojišče	CFU/ml
Z1	COH	0
Z1	TSA	0 (kontaminacija)
Z2	COH	Konfluentno
Z2	TSA	Konfluentno
Z3	COH	3,3
Z3	TSA	3,3
Z4	COH	570,0
Z4	TSA	943,3

*V tabeli je predstavljeno povprečje CFU-jev/ml vseh redčitev. Zaradi konfluentno prerastle plošče pri zobni ščetki Z2 CFU/ml nismo računali.



Slika 5: Rast na ploščah z razmazanimi suspenzijami (najvišje neredčeno, sredina 10x in najnižje 100x redčitev) zobnih ščetk na ploščah TSA (bele) in COH (rdeče) po 24 urni inkubaciji pri 37 ˚C v aerobnih pogojih. A) Z1 – nova zobna ščetka, B) Z2 (14-letnica, ščetka v uporabi 6 mescev), C) Z3 (4-letnik, zobna ščetka v uporabi 1 leto), D) Z4 (49-letnica, zobna ščetka v uporabi 1 leto).

Največ bakterij je bilo zaznanih na zobni ščetki Z2. Tukaj smo zaznali konfluentno rast tudi pri 100x rečitvi, kar pomeni, da števila kolonij ni bilo mogoče prešteti, saj so prerastle celotno gojišče. Z zobne ščetke Z1 nismo uspeli izolirati nobene kolonije razen na plošči Z1 COH 100x redčitev, kar je najverjetneje posledica kontaminacije. Ta zobna ščetka je bila sterilna. Vse bakterijske kolonije so bile precepljene do posamezne kolonije in identificirane na MALDI – TOF.

4.1.2 Anaerobne bakterije

V treh primerih smo opazili rast anaerobnih bakterij na ploščah TSA Z2, Z3 in Z4 (Tabela 4). Po precepljanju kolonija iz suspenzije ščetke Z3 ni rastla. Kolonije na ploščah iz suspenzije ščetk Z2 in Z4, sta po precepljanju rastli in smo jih uspešno identificirali z metodo MALDI – TOF.

Tabela 4: Število kolonij na zobnih ščetkah zrastlih na ploščah COH in TSA po 5 dnevni inkubaciji pri 37 ℃ v anaerobnih pogojih in izpostavitvi etanolnemu šoki, pri kateri Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 ščetko 14-letnice uporabljano 6 mesecev, Z3 4-letnika uporabljano 1 leto in Z4 49-letnice uporabljano 1 leto. Precep predstavlja precepljeno bakterijsko kolonijo na novo ploščo, po tem ko smo po 5 dnevni inkubaciji pri temperaturi 37℃ in anaerobnih pogojih zaznali rast.

Plošča	**Rast po 5 dneh**	**Ali smo kolonije precepili?**	**Rast po 48 urah**
Z1 EtOH COH	/	/	/
Z1 EtOH TSA	/	/	/
Z2 EtOH COH	/	/	/
Z2 EtOH TSA	1 kolonija	Da	Rast
Z3 EtOH COH	/	/	/
Z3 EtOH TSA	1 kolonija	Da	Ni rasti
Z4 EtOH COH	/	/	/
Z4 EtOH TSA	1 kolonija	Da	Rast

4.2 Identificirane bakterije

Z identifikacijo smo nekatere vrste identificirali večkrat. Delež, uporabljen v rezultatih, je količnik med številom ponovitev posamezne vrste in številom vseh bakterij. Spodnja enačba (Enačba 2) prikazuje izračun deleža pojavnosti bakterije *Staphylococcus hominis:*

$$\frac{\text{Kolikokrat smo izolirali in identificirali bakterijo } Staphylococcus\ hominis}{Število\ vseh\ izolatov} \times 100 = \frac{22}{69} \times 100 \approx 32\% \tag{2}$$

Tabela 5: Vrste bakterij identificirane iz vzorcev zobnih ščetk z verjetnostjo identifikacije in številom čistih izolatov, ki so bili identificirani kot ista vrsta

Ime bakterije	Najvišja vrednost identifikacije	Kolikokrat smo izolirali in identificirali isto vrsto
Acinetobacter junii	2,38	1
Alkalihalobacillus clausii	1,85	1
Bacillus cereus	2,23	3
Bacillus licheniformis	2,23	1
Bacillus megaterium	2,35	1
Bacillus mycoides	1,72	1
Bacillus pumilus	2,12	4
Enterobacter hormaechei	2,41	2
Micrococcus luteus	2,32	3
Paenibacillus pabuli	2,06	1
Paenibacillus tylopili	1,9	1
Pseudomonas putida	2,12	1
Pseudomonas putida_Group	2,02	1
Staphylococcus capitis	2,17	1
Staphylococcus epidermis	2,17	2
Staphylococcus haemolyticus	2,44	2
Staphylococcus hominis	2,27	22
Staphylococcus saprophyticus	2,29	12

Staphylococcus warneri	1,89	2
Staphylococcus xylosus	2,14	1
Stenotrophomonas maltophilia	2,46	4

**V nadaljnih poskusih smo uporabljali seve, ki smo jih določili z najvišjo vrednostjo identifikacije. S cepilno zanko smo do čiste kulture precepljali kolonije, ki so se nam zdele različne.

Z metodo MALDI – TOF smo bakterije izolirane v čisti kulturi identificirali (Tabela 5). Največkrat identificirana vrsta je bila *Staphylococcus hominis*, ki je predstavljala 32% vseh identificiranih bakterij (n = 69), sledi *Staphylococcus saprophyticus* s 17% in *Stenotrophomonas maltophilia* ter *Bacillus pumilus* z 0,06%. Kot v sorodni raziskavi je tudi v naši najpogostejši rod bakterij najdenih v ustih *Staphylococcus*, ki je predstavljal 59% vseh rodov (Lu in sod., 2019). Surovi podatki o vseh bakterijah so predstavljeni v prilogi 1. Bakterije *Alkalihalobacillus clausii, Bacillus mycoides, Bacillus pumilus, Paenibacillus tylopili* in *Staphylococcus warneri* so bile določene z najnižjo vrednostjo identifikacije, ostale bakterije smo določili z visoko verjetnostjo.

4.3 Opis identificiranih bakterij

Tabela 6: Opis identificiranih bakterij

Ime bakterije	Kje je bakterija prisotna	Ali je bakterija patogena	Zanimivost
Micrococcus luteus (Luke, 2017)	Kožna mikrobiota (tudi zgornji del dihal)	Ne	Upira se zdravljenju z antibiotiki z upočasnitvijo glavnih presnovnih procesov
Staphylococcus hominis (Vasconcellos in sod., 2022)	Kožna mikrobiota	V primeru ljudi z močno oslabljenim imunskim sistemom	Večino sevov je dovzetnih za zdravljenje s penicilinom
Staphylococcus saprophyticus (Ehlers, Merrill, 2022)	Predstavnik flore ženskega genitalnega trakta in črevesja, najdemo jih tudi na	Lahko je patogena	Skupno povzroči 10–20 % okužb sečil. Pri ženskah, starih od 17 do 27 let, je drugi

	zelenjavi in sirnih izdelkih		najpogostejši vzrok za okužbe sečil, takoj za *Escherichijo coli*
Bacillus licheniformis (Parkinson, 2019)	Kontaminacija predvsem mlečnih izdelkov, kot tudi na ptičjem perju	Ima zmožnost sporulacije. Bakterija je nevarna samo za bolnike z oslabljenim imunskim sistemom	Pomemben v industrijski proizvodnji encimov
Staphylococcus haemolyticus (Eltwisy in sod., 2020)	Kožna flora	Je oportunistično patogen	Nekateri imajo sposobnost tvorbe biofimov in so posledično bolj odporni na antibiotike.
Bacillus cereus (Edward, 2010).	Vsesplošno prisotna bakterija	Lahko	Fakultativni anaerob, ki ima številne dejavnike virulence, je ena izmed bolj raziskanih bakterij. Kot ostali predstavniki tega rodu je sposobna tvorjenja zaščitne endospore.
Bacillus pumilus (Reyes-Cortes in sod., 2021).	Pogosta bakterija v prsti	Ne	visoka stopnja odpornosti na sol in vodikov peroksid, kot tudi sposobnost zaviranja rasti morskih patogenov

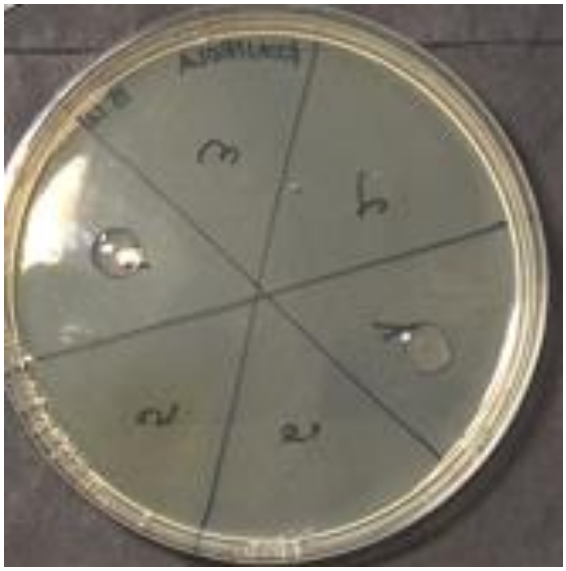
Alkalihalobacillus clausii (Urdaci, 2004)	Predstavnik črevesne mikrobiote sesalcev	Redko	Pogost predstavnik simbiotskih organizmov
Staphylococcus warneri (Muacevic, Adler, 2020)	Kožna mikroflora	Redko	Lahko povzroči spontani splav
Staphylococcus xylosus (Dordet-Frisoni in sod., 2007)	Kožna mikroflora	Ne	Pogosteje identificiran pri živalih, kot pri ljudeh
Staphylococcus epidermidis (Xuedong, Yuqing, 2015).	Kožna flora	Predvsem za ljudi z oslabljenim imunskim sistemom (drugače nizka stopnja patogenosti)	sposobna tvoriti biofilme
Enterobacter hormaechei (Hongfei in sod., 2022).	Prebavni trakt	Oportunistični patogen	Zelo slaba odpornost proti antibiotikom
Bacillus subtilis (Errington, Van der Aart, 2020).	Pogosto najden v prsti	Ne	Hitra rast
Acinetobacter junii (Lee , 2020).	Lahko ga zasledimo v vodi in prsti	Ne	V zgodnjih fazah rasti so *Acinetobacter* spp. videti paličaste oblike, v stacionarni fazi pa pridobijo kokobacilarno obliko
Stenotrophomonas maltophilia (Lewis, Zaas, 2023).	Pogosto najdena pri hospitaliziranih bolnikih	Oportunistična bakterija	Pogosto najden pri hospitaliziranih bolnikih

Pseudomonas putida (Thomas in sod., 2013).	Splošno prisotna bakterija	Oportunistični patogen	Pogosto je zasledena na katetrih v bolnišnicah
Bacillus mycoides (Baron, 1996).	Zasledimo jo v prsti	Ne	Lahko tvori spore
Paenibacillus tylopili (Sáez-Nieto in sod., 2017)	Pogosto prisoten v prsti	Ne	Lahko se zaščiti s tvorbo endospor
Bacillus megaterium (Bunk in sod., 2010).	Najden v suhi hrani, mleku in medu	Ne	Znana po svoji velikosti in izjemni sposobnosti sintetiziranja beljakovin v biotehnologiji
Staphylococcus capitis (Douedi in sod., 2021).	Kožna mikroflora	Ne	najdena pri več kot 50% odraslih
Paenibacillus pabuli (Sáez-Nieto in sod., 2017).	Pogosto najden v prsti	ne	Lahko tvori spore

Večina identificiranih bakterij so predstavniki kožne mikrobiote, kar nekaj je predstavnikov črevesne mikrobiote (Tabela 6). Torej je obremenjenost zobnih ščetk z bakterijami v našem primeru predvsem iz okolice in ne toliko iz ustne mikrobiote.

4.4 Antibiogrami

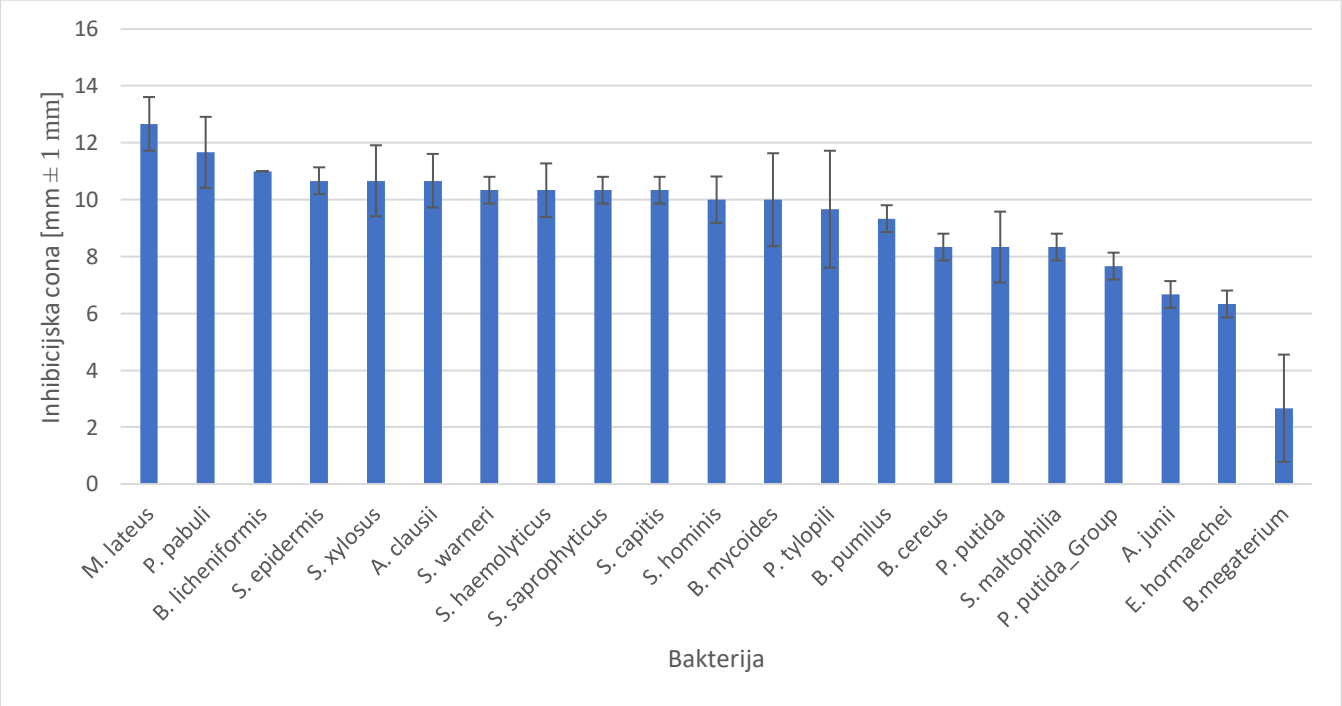
Na plošči, zgolj z učinkovinami, katerih vpliv na izbrane bakterije smo preučevali, po 24h inkubaciji pri 37 ˚C nismo zaznali rasti (slika 6).



Slika 6: Negativna kontrola antibakterijskih učinkovin

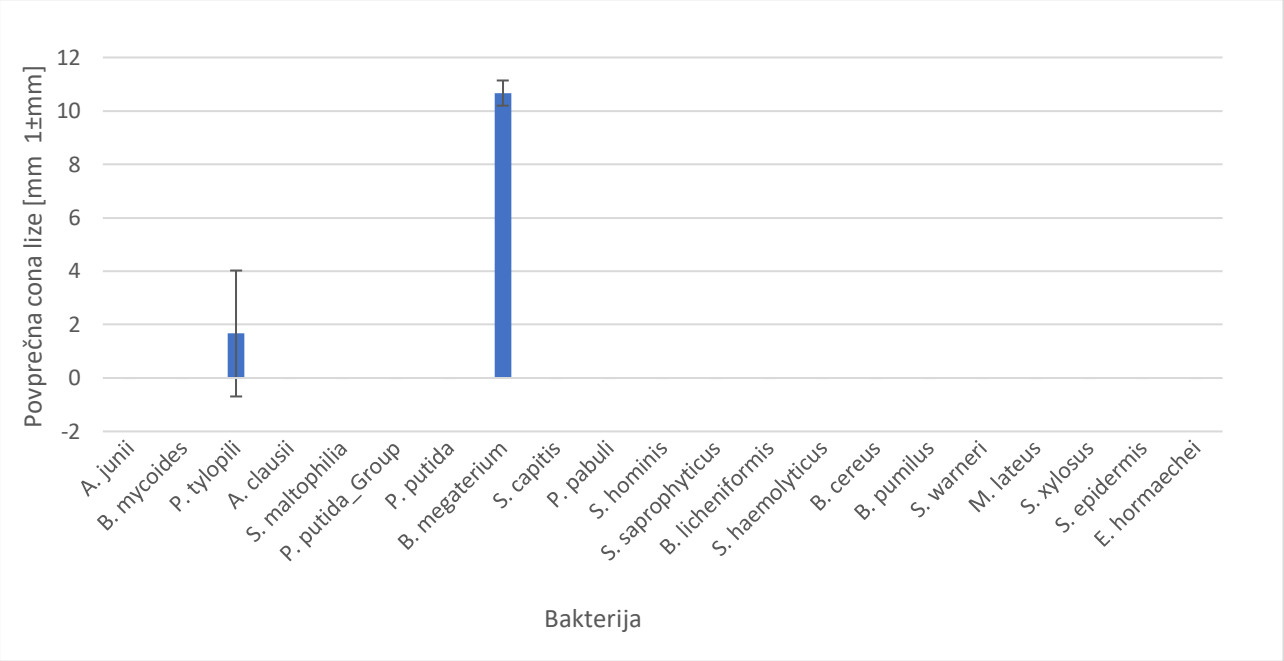
Antibiograme smo izvajali v treh ponovitvah, na spodnjih grafih so predstavljeni povprečni premeri inhibicijskih con. Povprečno cono inhibicije posamezne učinkovine na izbrano bakterijo smo izračunali iz podatkov treh ponovitev. Surovi podatki o premerih so predstavljeni v prilogi 2.

Učinkovina Meridol je inhibirala rast vseh identificiranih bakterij (Graf 1). Izračunali smo povprečno cono inhibicije za tri ponovitve vsake bakterije. Najmanjšo cono inhibicije je učinkovina Meridol imela pri bakteriji *Bacillus megaterium*, kjer je cona inhibicije znašala le 2,7 mm največja cona inhibicije pa je bila pri bakteriji *Micrococcus lateus*, kjer je povprečna vrednost cone inhibicije znašala 12,7 mm, torej je bila zelo dovzetna za Meridol. Ostale cone inhibicije so znašale med 6,3 in 10,7 mm.



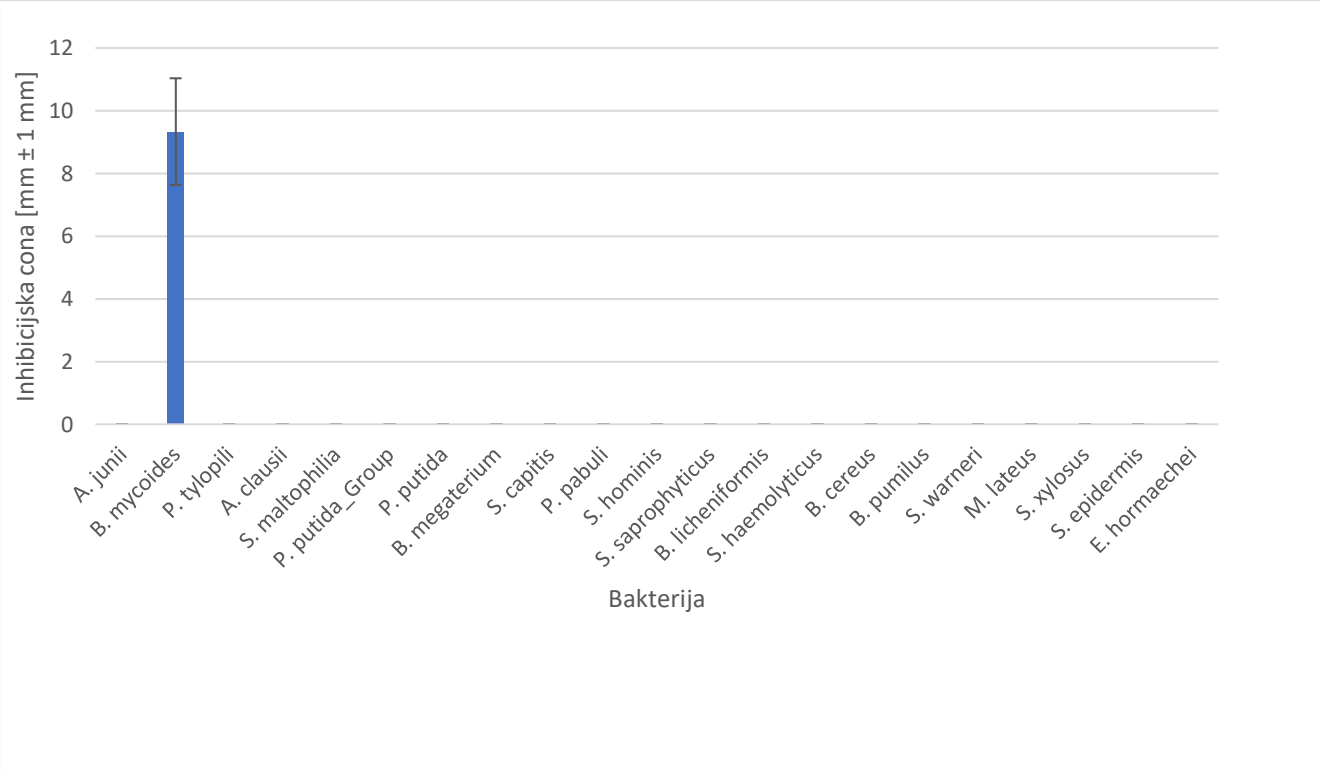
Graf 1: Povprečen premer cone inhibicije [mm] antibakterijske učinkovine ***Meridol*** *na identificirane bakterije. Intervali na grafu predstavljajo standardno napako.*

Učinkovina Colostrum os je inhibirala rast le dveh bakterij (Graf 2). In sicer *Paenibacillus tylopili* in *Bacillus megaterium*. Upoštevajoč standardno napako (2,4 mm) ne moramo potrditi učinka na bakterijo *Paenibacillus tylopili*, lahko pa ga potrdimo pri bakteriji *Bacillus megaterium*, kjer je povprečna cona inhibicije znašala 11 mm.



Graf 2: Povprečen premer cone inhibicije [mm] antibakterijske učinkovine ***Colostrum os*** *na identificirane bakterije. Intervala na grafu predstavljajo standardno napako.*

Žajbljev čaj s koncentracijo 0,25 g/ml je imel učinek zgolj na bakterijo *Bacillus mycoides* pri kateri je povprečna cona inhibicije znašala 9 mm. Ta bakterija je prisotna v prsti in je celo zmožna tvorbe endospor, vendar očitno žajbelj proti njej učinkuje.



Graf 3: Povprečen premer cone inhibicije [mm] ***žajbljevega čaja koncentracije 0,25 g/ml*** *na identificirane bakterije. Interval na grafu predstavljajo standardno napako.*

Ostale učinkovine na identificirane bakterije niso imela vpliva, zato njihovega grafa ne bomo prikazali. Podatki so predstavljeni v prilogi 2.

5 Razprava

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti katere mikroorganizme lahko najdemo na rabljenih in novih zobnih ščetkah, ter preveriti ali se te ujemajo z mikroorganizmi identificiranimi v sorodnih raziskavah. Nadalje na čistih kulturah izoliranih bakterij preveriti učinkovanje ustnih vodic in naravnih „protimikrobnih“ sredstev (žajbelj, olje za izpiranje ust).

V raziskavi smo uporabili tri zobne ščetke posameznikov starih 4, 14 in 49 let. Ščetke so bile v uporabi 1 leto ali 6 mescev (Tabela 1). S spiranjem zobnih ščetk v fiziološki raztopini in gojenjem suspenzije bakterij na dveh različnih trdnih gojiščih (TSA in COH) smo uspeli izolirati 21 različnih vrst bakterij v čisti kulturi (Tabela 6). Identifikacijo smo opravili z metodo MALDI – TOF (Bruker). Med najpogosteje izoliranimi predstavniki so bile bakterije rodu *Staphylococcus,* ki so predstavljale 59% vseh identificiranih rodov (n = 69). Znotraj tega rodu je bila najpogostejša vrsta *Staphylococcus hominis,* ki smo jo identificirali v 32% primerov. Rezultati naše raziskave se ne skladajo z rezultati raziskave, ki so jo izvedli raziskovalci iz Chosun University in ugotovili, da so na ščetkah shranjenih v kopalnici v največji meri prisotni predstavniki rodu *Streptococcus* (19,73%), *Pseudomonas* (16,08%), *Enterococcus* (8,16%), in *Neisseria* (7,04%). Medtem ko so na ščetkah, ki so jih shranjevali izven kopalnice našli predstavnike rodu *Enterococcus* (30,76%), *Pseudomonas* (21,85%), *Streptococcus* (14,94%), in *Lactobacillus* (5,15%) (Yeon Lee, Young Lee, 2019). Omenjena raziskava je imela nekoliko večji vzorec zobnih ščetk (n = 10) v primerjavi z našo raziskavo (n = 4). Starostna skupina uporabnikov je bila med 20 in 50 let, medtem ko smo imeli mi dva uporabnika mlajša od 20 let. Zobne ščetke uporabljene v naši raziskavi so bile shranjene v kopalnici, polovica vzorca prej omenjene raziskave pa je zobne ščetke shranjevala v pisarni. Bakterije so identificirali s pomočjo analize DNA, ki je v primerjavi s sistemom MALDI – TOF sicer zanesljivejša, vendar časovno in finančno veliko bolj potratna. Rezultati naše študije se lahko razlikujejo tudi zaradi drugačnega okolja. Korejska kultura prehranjevanja se razlikuje od evropske, kar vpliva na pojavnost različnih rodov bakterij v ustih.

Del prve hipoteze, ki je predpostavljala, da bodo n*a zobnih ščetkah najpogosteje identificirane bakterije iz človeške ustne mikrobiote* ne moramo potrditi (Tabela 6). Poleg bakterije *Bacillus cereus* (Edward, 2010) in *Micrococcus luteus* (Luke, 2017), ki sta potrjeno prisotni v ustni mikrobiotismo smo identificirali še *Enterobacter hormaechei* (Hongfei in sod., 2022), *Bacillus subtilis* (Errington, Van der Aart, 2020) in *Alkalihalobacillus clausii* (Urdaci, 2004), ki so pogostejši v črevesju. Ostale bakterije so bolj pogosti predstavniki drugih ekoloških niš, kot so zemlja ali koža… Te rezultate lahko obrazložimo kot prenos bakterij iz prej omenjenih okolij

na zobno ščetko. Do tega pride, kot posledica slabe higiene ali shranjevanja. Če bi želeli izolirati bakterije direktno iz ust bi morali vzeti bris ust, saj je le ta bolj zanesljiv kot zobne ščetke. Zobne ščetke vključene v našo raziskavo so bile v uporabi dlje časa (6 do 12 mescev) od priporočenega časa 3 mescev. V tem času se je bakterijska obremenitev na ščetkah zgolj povečevala, kar je najbolj opazno pri zobni ščetki Z2 (Slika 5B), kjer smo kljub redčitvam imeli popolnoma prerastle plošče. Niti ne moramo potrditi dela hipoteze, ki je predvideval, da bomo izolirali bakterije, *ki so najpogosteje identificirane tudi v drugih raziskavah* (Yeon Lee, Young Lee, 2019).

Testirali smo 71 posameznih kolonij iz čistih kultur. Zgolj enkrat se je zgodilo, da identifikacija ni bila mogoča. Z visoko verjetnostjo (2,00 do 3,00) smo identificirali 54 kolonij, s srednjo verjetnostjo (1,70 do 1,99) pa 16 kolonij (Tabela 5).

Prvi del druge hipoteze, ki je predpostavljal, da bomo *na izbranih zobnih ščetkah identificirali tudi bakterije, ki so sposobne tvorbe spor*, lahko v celoti potrdimo. Po izpostavitvi etanolnemu šoku (resuspendirali smo jih v 70% raztopini 100% etanola) in anaerobnih pogojih rasti sta preživeli dve koloniji. Identificirali smo bakteriji *Cutibacterium acnes* iz zobne ščetke Z2 in *Terrisporobacter glycolicus* iz zobne ščetke Z4. Bakterija *Cutibacterium acnes* je predstavnik človeške kožne mikrobiote in znan povzročitelj aken (Constance in sod., 2021). Bakterija *Terrisporobacter glycolicus* je redko izoliran patogen in predstavnik črevesne mikrobiote (Matthew in sod., 2016). Kolonijo smo zaznali tudi na tretji zobni ščetki Z3, vendar po precepljanju ni bilo rasti. Bakterijske spore so izjemno odporne na zunanje razmere, zato ni presenetljivo da smo jih našli tudi na zobnih ščetkah. Drugi del hipoteze, ki je predpostavljal, *da bodo ščetke, ki so v uporabi dlje časa bolj bakterijsko obremenjene* moramo zavreči, saj je bila najbolj obremenjena zobna ščetka Z2, ki je bila v uporabi pol leta v primerjavi z zobnima ščetkama Z3 in Z4 ki sta bili v uporabi 1 leto.

Z rezultati naše raziskave lahko potrdimo tretjo hipotezo, ki je predpostavljala, *da bodo tako nova zobna ščetka, kot testirane učinkovine sterilne*. Na ploščah na katere smo razmazali suspenzijo fiziološke raztopine, v kateri smo sprali popolnoma novo zobno ščetko po 24 urah gojenja nismo našli nobene bakterijske kolonije razen na TSA plošči s 100x rečitvijo. Ker je bila ta bakterija *Micrococcus luteus*, ki velja za splošnega predstavnika kožne mikrobiote in ker na ploščah z manjšo redčitvijo ni bilo rasti, lahko ta rezultat pripišemo kontaminaciji plošče. Kontrola testiranih učinkovin ki jih kupimo v lekarnah ali drogerijah je pokazala, da so

pred uporabo sterilne, saj po nanosu na gojitveno ploščo in 24 urni inkubaciji pri 37 °C ni bilo vidne rasti bakterijskih kolonij.

Četrto hipotezo, ki je predpostavljala, da *bodo protibakterijske učinkovine brez prisotnosti alkoholov prav tako zavrle rast bakterij,* lahko le delno potrdimo. Antiseptična vodica Meridol je zavrla rast vseh bakterij, najmanjši učinek je imela na bakterijo *Bacillus megaterium,* kjer je povprečna cona inhibicije znašala le 2,7 mm. Na to bakterijo je bolj učinkovala antiseptična vodica Colostrum os, s povprečno cono inhibicije 10,6 mm (Graf 1 in 2). Antiseptična ustna vodica Colostrum os je delovala tudi na bakterijo *Paenibacillus tylopili,* vendar je bil povprečen premer inhibicije (1,67 mm) upoštevajoč standardno napako (2,36 mm) statistično zanemarljiv. Žajbljev čaj je učinkoval le na bakterijo *Bacillus mycoides,* pri čemer je bila razlika v učinku med žajbljevega čaja in Meridoloa na to bakterijo statistično zanemarljiva (Graf 1 in 3). Testirani učinkovini Terra Naturi in Alverde, katerih namen je zaščita ustne votline pred bakterijami že po 20 minutnem izpiranju ust, sta se izkazali za neučinkoviti proti testiranim bakterijskim sevom.

Kot najbolj učinkovito se je izkazala učinkovina Meridol, ki vsebuje ksilitol (*ang. xylitol*). Ta posreduje že dokazano inhibitorno sposobnost na določene seve, kot je *Streptococcus mutans* (Nayak in sod., 2014). Pokazali smo torej, da so ustne vodice na bazi alkohola (če tudi ne na bazi etanola) učinkovitejše od naravnih pripravkov.

Kot navajata nam sorodni raziskavi bi naj bilo namakanje zobnih ščetk v antiseptičnih ustnih vodicah eden od zanesljivejših načinov zmanjšanja bakterijske obremenjenosti ščetk (Kitts, 2021; Bélanger, 2011). V naši raziskavi smo potrdili delovanje učinkovine Meridol in Colostrum os na posamezne bakterijske vrste izolirane iz zobnih ščetk.

Za nadaljnjo raziskovanje predlagamo, da se v analizo vzamejo še elektronske zobne ščetke, saj nekateri proizvajalci obljubljajo preprečevanje razvoja bakterij na njihovih zobnih ščetkah. Priporočljivo je tudi razširiti raziskavo na večji vzorec zobnih ščetk, ki bi bile v uporabi enako časa oz. v intervalu, pred katerim je priporočljiva menjava zobne ščetke (3 do 4 mesece) ter zajeti več starostnih skupin. Predlagamo tudi, da se meri korelacija med časom uporabe in bakterijsko obremenjenostjo. Prav tako priporočamo, da se razišče učinkovanje posameznih sestavin najučinkovitejše ustne vodice v naši raziskavi – Meridola, z namen ugotoviti katere učinkovine naj vsebujejo ustne vodice, ki nam bodo v boju proti bakterijam resnično pomagale (poleg etanola, na katerega so nekateri občutljivi, ni pa priporočljiv tudi za otroke).

6 Družbena odgovornost

Z raziskovalno nalogo smo dokazali, da številna naravna sredstva (olja za izpiranje ust, žajbelj…) niso učinkovita za uničenje bakterij. Nekatere druge raziskave (Kitts, 2021; Bélanger, 2011) so sicer dokazale učinkovitost nekaterih ustnih vodic z dodanim alkoholom (Listerine) ali vodikovega peroksida na zmanjšanje bakterijske obremenjenosti zobnih ščetk. Podoben učinek ima tudi sterelizacija z UV – svetlobo. Ljudi v zadnjem času privlačijo etikete naravno, zato smo se odločili da preizkusimo bolj takšna sredstva za boj proti bakterijam na zobnih ščetkah. Kljub majhnemu vzorcu zobnih ščetk, z nalogo apeliramo, da je najboljši način za uporabo ščetke, ki je najmajnj bakterijsko obremenjena, njena redna menjava (na vsaj tri mesece). Zobno ščetko moramo po uporabi temeljito izprati pod toplo vodo in jo shraniti ločeno od zobnih ščetk drugih članov, v nezaprti posodi. Priporočljivo je tudi, da jo ločimo od ostalih pripomočkov, ki bi povzročili potencialno kontaminacijo (ščetke za čiščenje zobnih aparatov, protez, ostalih pripomočkov za osebno higieno...). Za izpiranje ust pa priporočamo alkoholne ustne vodice, saj alkohol uniči celično steno bakterije, ji s tem prepreči metabolizem in celica propade.

7 Viri in literature

Dayoub., B. M., in sod. (1977). *Microbial contamination of toothbrushes.* Journal of Dental Research. Retrieved from https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA030467

Abhishek M., in sod. (2007). *Bacterial contamination and decontamination of toothbrushes after use.* The New York State Dental Journal. Retrieved from https://www.proquest.com/openview/4a323c359696c3864ddb939ad5175741/1?pq-origsite=gscholar&cbl=41679

Baron S. (1996). *Medical Microbiology.* University of Texas Medical Branch at Galveston.

Bélanger, M. (2011, junij). Disinfection of toothbrushes contaminated with Streptococcus mutans. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/51602883

Bunetel L., in sod. (2000). *n vitro evaluation of the retention of three species of pathogenic microorganisms by three different types of toothbrush.* Oral Microbiology and Immunology. Retrieved from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1399-302x.2000.150508.x

Bunk B., in sod. (2010). *A short story about a big magic bug.* National Librari of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3026448/

Caudry S., in sod. (1995). *Contaminated toothbrushes and their disinfection.* Canadian Dental Association. Retrieved from https://europepmc.org/article/med/7614433

Constance in sod. (2021). *Cutibacterium acnes as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7913060/

Dordet-Frisoni E., in sod. (2007). *Genomic Diversity in Staphylococcus xylosus.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168225/

Douedi S., in sod. (2021). *Staphylococcus capitis Endocarditis of a Native Valve.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8289399/

Dragaš, A. Z. (1996). *Oralna bakteriologija.* Ljubljana: DZS.

Edward J. B. (2010). *Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863360/

Efstratiou M., in sod. (2007). *Kontaminacija zobne ščetke z antibakterijskimi lastnostmi s peroralnih mikroorganizmov.* Dnevnik zobozdravstvo. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300571206001990

Ehlers S., Merrill A. S. (2022). *Staphylococcus saprophyticus.* National Library of Medicine. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29493989/

Eltwisy O. H. in sod. (2020). *Pathogenesis of Staphylococcus haemolyticus on primary human skin fibroblast cells.* National Library of medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7549902/

Errington J., Van der Aart T. L. (2020). *Microbe Profile: Bacillus subtilis: model organism for cellular development, and industrial workhorse.* National Librari of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7376258/

Hongfei S., in sod. (2022). *Case report of enterobacter hormaechei in sheep with respiratory disease and death.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8790845/

Kadner J., R. (2023). *Bacteria*. Retrieved from Britanica: https://school.eb.co.uk/levels/advanced/article/bacteria/110416

Kitts E. (2021, februar 11). *HOW TO DISINFECT A TOOTHBRUSH: TIPS ON HOW TO KEEP THEM CLEAN*. Retrieved from Soundview: https://soundviewfamilydental.com/blog/how-to-disinfect-a-toothbrush-tips-on-how-to-keep-them-clean/

Koce J.D., Zalar P., Belušič G., Vittori M., Turk M. (2018). *Biologija 2, O zgradbi in delovanju organizmov, učbenik za v 2. letniku gimnazij in srednjih strokovnih šol.* Ljubljana: Mladinska knjiga.

Lapanje, A., Rijavec, T. . (2019). *Mikrobiota ustne votline - Human oral microbiome.* Ljubljana: Inštitut Jožefa Štefana.

Lee G. (2020). *Diseases Caused by Acinetobacter and Stenotrophomonas Species.* ScinceDirect. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/acinetobacter-junii

Lewis S. S., Zaas A. (2023). *Stenotrophomonas maltophilia.* UpToDate. Retrieved from https://www.uptodate.com/contents/stenotrophomonas-maltophilia

Lu M., in sod. (2019, marec). *Chinese roots global impact*. Retrieved from Oral microbiota: A new view of body health: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453018301642

Luke J. (2017). *MICROCOCCUS LUTEUS*. Retrieved from BathASU: https://www.lukejerram.com/glass/gallery/micrococcus-luteus

Masadeh M. M., in sod. (2013, oktober 5). Retrieved from Antimicrobial Activity of Common Mouthwash Solutions on Multidrug-Resistance Bacterial Biofilms: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748664/

Masadeh M. M., in sod. (2015). *Antimicrobial Activity of Common Mouthwash Solutions on Multidrug-Resistance Bacterial Biofilms.* National Library of medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748664/

Matthew in sod. (2016). *A case report of a deep surgical site infection with Terrisporobacter glycolicus/T. Mayombei and review of the literature.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5043541/

MICROBIOLOGIE CLINIQUE. (2022). *Tryptic Soy Agar (TSA)*. Retrieved from https://microbiologie-clinique.com/trypticase-soy-agar-principle-interpretation.html

Mouhammad J. Al., Gawahir A., Wael G. (2022). *Underrecognized pathogen; Staphylococcus warneri-associated native mitral valve endocarditis in an immunocompetent host: A case report and literature review.* Wiley Online Library. Retrieved from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ccr3.5591

Muacevic A., Adler R. J. (2020). *Staphylococcus warneri: Skin Commensal and a Rare Cause of Urinary Tract Infection.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7263002/

Nayak A.P., in sod. (2014). *The effect of xylitol on dental caries and oral flora.* National Library of Medicine. doi:10.2147/CCIDE.S55761

Parkinson J. T. (2019). *Specific Infectious Diseases Causing Infertility and Subfertility in Cattle.* ScienceDirect. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/bacillus-licheniformis

Podržaj, S. (2011). *Protibakterijska učinkovitost različnih vrst medu na paradontopatogene bakterije in ustne streptokoke.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani.

Priya N. D,.Revati D. (2019). *Oral microbiome: Unveiling the fundamentals.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6503789/

Priya Nimish D., Revati D. (2019, april). *National Library of Medicine*. Retrieved from Oral microbiome: Unveiling the fundamentals: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6503789/

Raiyani M. C., in sod. (2015, avgust 6). *National Library of Medicine*. Retrieved from Assessment of microbial contamination on twice a day used toothbrush head after 1-month and 3 months: An in vitro study: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4630762/

Raiyani M., C. (2015). *Assessment of microbial contamination on twice a day used toothbrush head after 1-month and 3 months: An in vitro study.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4630762/

Reyes-Cortes L. J., in sod. (2021). *Physiological and Genomic Analysis of Bacillus pumilus UAMX Isolated from the Gastrointestinal Tract of Overweight Individuals.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8156450/

Sáez-Nieto J.A., in sod. (2017). *Paenibacillus spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5484988/

Sato S., in sod. (2005). *Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an in vivo evaluation.* Quintessence International. Retrieved from http://www.quintpub.com/userhome/qi/qi_36_10_pedrazzi_7.pdf

Smiles by Shields. (2022). *DIFFERENT TYPES OF BACTERIA PRESENT IN THE MOUTH*. Retrieved from https://www.smilesbyshields.com/different-types-of-bacteria-present-in-the-mouth/

Sulyanto M., R., in sod. (2019). *The Predominant Oral Microbiota Is Acquired Early in an Organized Pattern.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6646312/

Thomas S. B., in sod. (2013). *A Lethal Case of Pseudomonas putida Bacteremia Due to Soft Tissue Infection.* National Library of Medicine. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3673730/

Univerza Arkansas za medicinske vede. (2019, marec 8). *UAMSHealth*. Retrieved from Can Your Toothbrush Make You Sick?: https://uamshealth.com/medical-myths/can-your-toothbrush-make-you-sick/

Urdaci C. M. . (2004). *Bacillus clausii probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities.* Journal of Clinical Gastroenterology. doi:10.1097/01.mcg.0000128925.06662.69

Vasconcellos D., in sod. (2022). *Staphylococcus hominis Infective Endocarditis Presenting with Embolic Splenic and Renal Infarcts and Spinal Discitis.* Case Reports in Infectious Diseases. Retrieved from https://www.hindawi.com/journals/criid/2022/7183049/

vede, U. A. (2019, marec 8). *UAMSHealth*. Retrieved from Can Your Toothbrush Make You Sick?: https://uamshealth.com/medical-myths/can-your-toothbrush-make-you-sick/

Xian P. in sod. (2022, marec 2). *International Journal of Oral science*. Retrieved from Oral microbiota in human systematic diseases: https://www.nature.com/articles/s41368-022-00163-7

Xuedong Z., Yuqing L. (2015). *Atlas of Oral Microbiology.* From Healthy Microflora to Disease. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/staphylococcus-epidermidis

Yeon Lee S., Young Lee S. (2019). *Chosun University ORAL BIOLOGY RESEARCH*. Retrieved from Assessment of bacterial contamination of toothbrushes using Illumina MiSeq: http://www.chosunobr.org/journal/view.html?uid=234&vmd=Full

Zachary M. B. (2020). *Patterns of Oral Microbiota Diversity in Adults and Children: A Crowdsourced Population Study.* Scientific reports. Retrieved from https://www.nature.com/articles/s41598-020-59016-0

Zachary M. B., in sod. (2020, februar 7). *Scientific reports*. Retrieved from Patterns of Oral Microbiota Diversity in Adults and Children: A Crowdsourced Population Study: https://www.nature.com/articles/s41598-020-59016-0

Priloge

Tabela 7 Priloga 1: Surovi podatki o identificiranih bakterijah z nekaterimi značilnostmi, pri čemer kratica Z1 pomeni bakterijo iz nove zobne ščetke, Z2 bakterijo iz ščetke 14-letnice, ki je bila v uporabi 6 mescev, Z3 bakterijo iz zobne ščetke 4-letnega dečka, ki je bila v uporabi 1 leto in Z4 bakterijo iz zobne ščetke 49-letnice, ki je bila v uporabi 1 leto

ID vzorca	Vrsta bakterije	Verjetnost	gram pozitivne/negativne	aerobnos/anaerobnost	Ali je bakterija pogosto prisotna v ustni mikrobioti (DA/NE)	Ali je bakterija patogena
Z1	*Micrococcus luteus*	2,18	pozitivna	aerobna	NE (značilna za kožno mikrobioto)	v redkih primerih
Z2.1	*Acinetobacter junii*	2,38	negativna	aerobna	NE (značilna za kožno mikrobioto)	redko
Z2.2	*Enterobacter hormaechei*	2,41	negativna	raste aerobno in anaerobn	NE (lahko jo najdemo v črevesju)	DA
Z2.3	*Stenotrophomonas maltophilia*	2,35	negativna	aerobna	NE	pogost oportunist
Z2.4	*Stenotrophomonas maltophilia*	2,4	negativna	aerobna	NE	pogost oportunist
Z2.5	*Stenotrophomonas maltophilia*	2,46	negativna	aerobna	NE	pogost oportunist
Z2.6	*Pseudomonas putida_Group*	2,02	negativna	aerobna (kemoorganotrof	NE	redek oportunistični mikrob
Z2.7	*Enterobacter hormaechei*	2,29	negativna	raste aerobno in anaerobn	NE (lahko jo najdemo v črevesju)	
Z2.8	*Pseudomonas putida*	2,12	negativna	aerobna (kemoorganotrof	NE	DA
Z2.9	*Stenotrophomonas maltophilia*	2,44	negativna	aerobna	NE	pogost oportunist
Z3.1	*Bacillus pumilus*	1,82	pozitivna	aerobna	NE (značilna za kožno mikrobioto)	NE
Z3.2	*Bacillus mycoides*	1,72	pozitivna	aerobna (lahko preživi tudi	NE	NE
Z4.1	*Paenibacillus tylopili (tylopilus)*	1,9	pozitivna	aerobna	NE	NE
Z4.10	*Bacillus megaterium*	2,35	pozitivna	aerobna	NE	NE
Z4.11	*Bacillus cereus*	2,19	negativna	aerobna	NE	DA
Z4.12	*Staphylococcus saprophyticus*	2,05	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.13	*Staphylococcus hominis*	2,06	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.14	*Staphylococcus saprophyticus*	2,06	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.15	*Staphylococcus saprophyticus*	2,19	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.16	*Bacillus pumilus*	1,96	pozitivna	aerobna	NE	NE
Z4.17	*Staphylococcus saprophyticus*	2,05	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.18	*Staphylococcus saprophyticus*	2,13	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.19	*Staphylococcus hominis*	2,07	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.2	*Staphylococcus saprophyticus*	2,12	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.20	*Staphylococcus capitis*	2,12	pozitivna	anaerobna	NE	oportunistični patogen
Z4.21	*Staphylococcus hominis*	2,24	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.22	*Staphylococcus epidermidis*	2,14	pozitivna	fakultativni anaerobna (a k	NE	oportunistični patogen
Z4.23	*Staphylococcus hominis*	2,07	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.24	*Staphylococcus hominis*	2,04	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.25	*Staphylococcus hominis*	2,09	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.26	*ni identifikacije*				NE	
Z4.27	*Paenibacillus pabuli*	2,06	pozitivna		NE	NE
Z4.28	*Staphylococcus hominis*	2,24	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.29	*Bacillus subtilis*	1,85	pozitivna	(fakultativni anaerobi)	NE lahko ga najdemo v prebavnem traktu	NE
Z4.3	*Staphylococcus hominis*	2,22	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.30	*Staphylococcus hominis*	2,18	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.31	*Staphylococcus saprophyticus*	2,29	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.32	*Bacillus licheniformis*	2,23	pozitivna	anaerobna	NE	patogen pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemo
Z4.33	*Staphylococcus haemolyticus*	2,44	pozitivna	anaerobna	NE	oportunistični patogen
Z4.34	*Bacillus cereus*	2,09	negativna	aerobna	DA	DA
Z4.35	*Staphylococcus saprophyticus*	2,19	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.36	*Staphylococcus hominis*	2,06	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.37	*Staphylococcus hominis*	2,19	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.38	*Bacillus cereus*	2,23	negativna	aerobna	DA	DA
Z4.39	*Bacillus pumilus*	2,12	pozitivna	aerobna	NE	NE
Z4.4	*Alkalihalobacillus clausii*	1,85	pozitivna	(fakultativni) anaerobi	DA vendar pogosteje v prebavilih	NE
Z4.40	*Staphylococcus warneri*	1,71	pozitivna	aerobna	NE	v zadnjih časih poročajo o njegovi patogenosti.
Z4.41	*Staphylococcus hominis*	2,23	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.42	*Staphylococcus hominis*	2,21	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.43	*Staphylococcus saprophyticus*	2,15	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.44	*Staphylococcus warneri*	1,89	pozitivna	aerobna	NE	v zadnjih časih poročajo o njegovi patogenosti
Z4.45	*Staphylococcus hominis*	2,11	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.46	*Staphylococcus haemolyticus*	2,3	pozitivna	anaerobna	NE	oportunistični patogen
Z4.47	*Micrococcus luteus*	2,32	pozitivna	aerobna	DA	v redkih primerih pri imunsko oslabljenih bolnikih
Z4.48	*Staphylococcus hominis*	2,14	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.49	*Staphylococcus hominis*	2,07	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.5	*Staphylococcus hominis*	2,07	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.50	*Staphylococcus hominis*	2,2	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.51	*Staphylococcus saprophyticus*	2,21	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.52	*Staphylococcus hominis*	2,27	pozitivna	aerobna	NE (značilna za kožno mikrobioto)	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.53	*Staphylococcus xylosus*	2,14	pozitivna	aerobna	NE	redeko povzroča oportunistične okužbe
Z4.54	*Staphylococcus saprophyticus*	1,99	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.55	*Staphylococcus epidermidis*	2,17	pozitivna	fakultativni anaerobna	NE (značilna za kožno mikrobioto)	lahko povzroča oportunistične okužbe
Z4.56	*Micrococcus luteus*	2,26	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.57	*Staphylococcus saprophyticus*	2,19	pozitivna	aerobna	NE	DA
Z4.6	*Staphylococcus hominis*	2,21	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.7	*Staphylococcus hominis*	2,16	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.8	*Staphylococcus hominis*	2,12	pozitivna	aerobna	NE	redko povzroča oportunistične okužbe
Z4.9	*Bacillus pumilus*	1,73	pozitivna	aerobna	NE	NE
Z2. brez kisik	*Cutibacterium acnes*	1,99		anaerobna	NE	DA
Z4. brez kisik	*Terrisporobacter glycolicus*	2,03	pozitivna	anaerobna	NE	redko

Tabela 8 Priloga 2: Surovi podatki o premeru inhibicijskih con, pri čemer je IC=premer inhibicijske cone [mm ± 1mm], X=povprečje premera, SN=starndardna napaka.

Probakterijski pripravek	Alverde		Alverde2	Alverde3	Meridol		Meridol2	Meridol3	Colostrum os		:olostrum os	:obstrum os	Terra Naturi		Terra Naturi	Terra Naturi3	Žajbelj 0,25 g/ml		jbelj 0,25 g/m	jbelj 0,25 g/m	Žajbel 0,1 g/ml		Žajbel 0,1 g/m	Žajbel 0,1 g/m	Žajbel 0,1 g/m	
Bakterija	IC	x	SD	SD	IC	x	SD	SD	IC	X	SD	SD	IC	X	SD	IC	IC	X	SD	SD	IC	X	SD	SD	IC	X
Acinetobacter junii	0	0	0		7	6,7	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Acinetobacter junii					7				0				0				0				0				0	
Acinetobacter junii					7				0				0				0				0				0	
Bacillus mycoides	0	0	0		8	10	2,2		0	0	0		0	0	0		10	9,3	1,7		0	0	0		0	0
Bacillus mycoides					12				0				0				7				0				0	
Bacillus mycoides	0	0	0		10	9,7	2,1		0	1,7	2,4		0	0	0		11				0				0	
Paenibacillus tylopili					12				0				0				0				0				0	
Paenibacillus tylopili					7				0				0				0				0				0	
Alkalihalobacillus clausii	0	0	0		12	10,7	0,9		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Alkalihalobacillus clausii	0				10				0				0				0				0				0	
Alkalihalobacillus clausii	0	0	0		10				0				0				0				0				0	
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	0		8	8,3	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Stenotrophomonas maltophilia	0				9				0				0				0				0				0	
Stenotrophomonas maltophilia					8				0				0				0				0				0	
Pseudomonas putida_Group	0	0	0		8	7,7	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Pseudomonas putida_Group					7				0				0				0				0				0	
Pseudomonas putida_Group					8				0				0				0				0				0	
Pseudomonas putida	0	0	0		10	8,3	1,2		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Pseudomonas putida					7				0				0				0				0				0	
Pseudomonas putida					8				0				0				0				0				0	
Bacillus megaterium	0	0	0		0	2,7	1,9		10	10,7	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Bacillus megaterium	0				4				11				0				0				0				0	
Bacillus megaterium	0				4				11				0				0				0				0	
Staphylococcus capitis	0	0	0		10	10,3	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Staphylococcus capitis	0				10				0				0				0				0				0	
Staphylococcus capitis	0				11				0				0				0				0				0	
Paenibacillus pabuli	0	0	0		12	11,7	1,2		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Paenibacillus pabuli	0				10				0				0				0				0				0	
Paenibacillus pabuli					13				0				0				0				0				0	
Staphylococcus hominis	0	0	0		10	10	0,8		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Staphylococcus hominis					9				0				0				0				0				0	
Staphylococcus hominis					11				0				0				0				0				0	
Staphylococcus saprophyticus	0	0	0		10	10,3	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Staphylococcus saprophyticus	0				10				0				0				0				0				0	
Staphylococcus saprophyticus	0				11				0				0				0				0				0	
Bacillus licheniformis	0	0	0		11	11	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Bacillus licheniformis	0				11				0				0				0				0				0	
Bacillus licheniformis	0				11				0				0				0				0				0	
Staphylococcus haemolyticus	0	0	0		11	10,7	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Staphylococcus haemolyticus	0				11				0				0				0				0				0	
Staphylococcus haemolyticus	0				10				0				0				0				0				0	
Bacillus cereus	0	0	0		8	8,3	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Bacillus cereus	0				8				0				0				0				0				0	
Bacillus cereus	0				9				0				0				0				0				0	
Bacillus pumilus	0	0	0		10	9,3	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Bacillus pumilus	0				9				0				0				0				0				0	
Bacillus pumilus	0				9				0				0				0				0				0	
Staphylococcus warneri	0	0	0		10	10,3	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Staphylococcus warneri	0				10				0				0				0				0				0	
Staphylococcus warneri	0				11				0				0				0				0				0	
Micrococcus lateus	0	0	0		14	12,7	0,9		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Micrococcus lateus	0				12				0				0				0				0				0	
Micrococcus lateus	0				12				0				0				0				0				0	
Staphylococcus xylosus	0	0	0		9	10,7	1,2		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Staphylococcus xylosus	0				12				0				0				0				0				0	
Staphylococcus xylosus	0				11				0				0				0				0				0	
Staphylococcus epidermis	0	0	0		11	10,7	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Staphylococcus epidermis	0				11				0				0				0				0				0	
Staphylococcus epidermis	0				10				0				0				0				0				0	
Enterobacter hormaechei	0	0	0		7	6,3	0,5		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0
Enterobacter hormaechei	0				6				0				0				0				0				0	
Enterobacter hormaechei	0				6				0				0				0				0				0	

Tabela 9: Priloga 3 število kolonij na zobni ščetki zrastli na ploščah TSA in COH po odvzemu brisa na aerobnih pogojih, pri čemer Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 zobno ščetko 14-letnice, katere ščetka je bila v uporabi 6 mescev, Z3 zobno ščetko 4-letnika, katerega ščetka je bila v uporabi 1 leto in Z4 zobno ščetko 49-letnice, katere ščetka je bila v uporabi 1 leto

Plošča	**Število kolonij**	**Opombe**
Z1 TSA 1x	0	
Z1 TSA 10x	0	
Z1 TSA 100x	0	
Z1 COH 1x	0	
Z1 COH 10x	0	
Z1 COH 100x	1	Kontaminacija
Z2 TSA 1x	Konfluentno	Precepljeno do posamezne kolonije
Z2 TSA 10x	Konfluentno	
Z2 TSA 100x	Konfluentno	
Z2 COH 1x	Konfluentno	
Z2 COH 10x	Konfluentno	
Z2 COH 100x	Konfluentno	
Z3 TSA 1x	1	
Z3 TSA 10x	0	
Z3 TSA 100x	0	
Z3 COH 1x	1	
Z3 COH 10x	0	
Z3 COH 100x	0	
Z4 TSA 1x	161	
Z4 TSA 10x	1	
Z4 TSA 100x	0	
Z4 COH 1x	173	Veliko število mikrokolonij
Z4 COH 10x	11	
Z4 COH 100x	0	

Tabela 10: Priloga 4 CFU/ml na posameznem gojišču po nanosu prvih redčitev pri čemer Z1 pomeni novo zobno ščetko, Z2 zobno ščetko 14-letnice, katere ščetka je bila v uporabi 6 mescev, Z3 zobno ščetko 4-letnika, katerega ščetka je bila v uporabi 1 leto in Z4 zobno ščetko 49-letnice, katere ščetka je bila v uporabi 1 leto

Zobna ščetka	**Redčitev**	**Vrsta plošče**	**CFU/ml**
Z1	1x	TSA	0
Z1	10x	TSA	0
Z1	100x	TSA	1000
Z1	1x	COH	0
Z1	10x	COH	0
Z1	100x	COH	0
Z2	1x	TSA	Konfluentno
Z2	10x	TSA	Konfluentno
Z2	100x	TSA	Konfluentno
Z2	1x	COH	Konfluentno
Z2	10x	COH	Konfluentno
Z2	100x	COH	Konfluentno
Z3	1x	TSA	1000
Z3	10x	TSA	0
Z3	100x	TSA	0
Z3	1x	COH	1000
Z3	10x	COH	0
Z3	100x	COH	0
Z4	1x	TSA	1610
Z4	10x	TSA	10
Z4	100x	TSA	0
Z4	1x	COH	1730
Z4	10x	COH	110
Z4	100x	COH	0