

Henna Ikäläinen

KARIOGEEENISEN *STREPTOCOCCUS MUTANS* BIOFILMIN KARAKTERISOINTI  
*IN VITRO* KOLMELLA MENETELMÄLLÄ

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2022

Henna Ikäläinen

KARIOGEEENISEN *STREPTOCOCCUS MUTANS* BIOFILMIN KARAKTERISOINTI  
*IN VITRO* KOLMELLA MENETELMÄLLÄ

Turun yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen laitos

Kevätlukukausi 2022

Vastuhenkilö: Vuokko Loimaranta

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

IKÄLÄINEN, HENNA: Kariogeenisen *Streptococcus mutans* biofilmin karakterisointi *in vitro* kolmella menetelmällä.

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 30 s.

Kariologia

Tammikuu 2022

---

Tämän opinnäytteen tarkoituksena oli tutkia kariogeenisen *S. mutans*'n kolmen eri kannan (*S. mutans* NCTC 10449, *S. mutans* Ingbritt ja *S. mutans* C12366) muodostamaa biofilmiä kolmella laboratoriomenetelmällä, joilla saatiin tietoa biofilmin määrästä, tarttumisesta ja sisäisestä pH:sta. Saatuja tuloksia pohdittiin karioksen kannalta ja verrattiin aiempiin tutkimuksiin aiheesta.

*S. mutans*'n kantoja tutkittiin mikrotiitterilevybiofilmi tutkimuksella, impedanssi-pohjaisella mittauksella ja pH:n seurannalla. Biofilmin sisäisen pH:n muuttumista reaaliajassa mitattiin ensimmäistä kertaa PreSens-laitteella ja saatuja tuloksia verrattiin perinteisiin mikrotiitterilevybiofilmi tutkimukseen ja impedanssipohjaiseen mittaukseen. Biofilmiä kasvatettiin BHI:ssa ja pastöroidussa syljessä sakkaroosin läsnä ollessa. Biofilmi muodostui 0 %, 0,1 %, 0,5 % ja 1 % sakkaroosipitoisuuksissa.

Biofilmin määrä, tarttuminen ja pH muuttuivat sakkaroosin läsnä ollessa sekä syljessä että BHI:ssa kasvatettuna: sakkaroosin vaikutuksesta biofilmin määrä ja tarttuminen lisääntyivät ja biofilmin sisäinen pH laski. Biofilmin muodostuessa BHI:ssa, pH laski myös ilman sakkaroosia. Biofilmin määrää mittaavissa tutkimuksissa ei biofilmiä muodostunut merkittävästi kummassakaan kasvatusalustassa ilman sakkaroosia. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että hapon muodostumiseen riittää BHI:n sisältämä glukoosi, mutta biofilmin muodostumiseen tarvitaan sakkaroosia. Tutkituista kannoista *S. mutans* C12366 oli virulentein etenkin syljessä kasvatettuna. *S. mutans* -kannat käyttäytyvät eri tavalla, ja on tärkeää tutkia biofilmiä useammalla eri menetelmällä.

Asiasanat: *streptococcus mutans*, biofilmi, karies

## SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	1
2 TUTKIMUSMENETELMÄT.....	3
2.1 Mikroitiitterilevybiofilmi tutkimus.....	3
2.2 Biofilmin määrä ja tarttuminen .....	5
2.3 pH:n seuranta .....	5
3 TULOKSET .....	7
3.1 Mikroitiitterilevybiofilmi tutkimus.....	7
3.2 Biofilmin määrä ja tarttuminen .....	11
3.3 pH:n seuranta .....	15
4 JOHTOPÄÄTÖKSET .....	19
LÄHTEET .....	24

## 1 JOHDANTO

Hammaskaries johtuu mikrobiomin dysbioosista, johon liittyy useita kariogeenisiä bakteerilajeja, kuten *Streptococcus mutans* (Eriksson ym. 2018, Simón-Soro ja Mira 2015). Karies on harvoin hengenvaarallinen, mutta on silti suuri ongelma terveyspalveluiden tarjoajille. Hampaan pintaa peittää biofilmi, joka koostuu miljoonista bakteerisoluuista, syljen polymeereistä ja ruokajätteistä. (Forssten ym. 2010.) Biofilmit ovat organisoituja mikrobiyhteisöjä, ja niitä ympäröi solunulkoisen matriksi. Biofilmit aiheuttavat monia ihmisten infektioita, kuten hammaskariesta. Kariogeenisen biofilmin kehittyminen johtuu ruokavaliosta ja mikrobiota-matriksivuorovaikutuksesta kiinteällä pinnalla. Sokerit edistävät matriksin muodostumista ja biofilmin happamoitumista. (Bowen ym. 2018.) Biofilmin kerääntyminen hampaan pinnalle altistaa hampaan bakteerien vaikutukselle, ja hapon tuotanto on välitön syy hampaan liukenemiseen (Bowen 2016). Hapon tuotannon lisäksi bakteerien kariogeenisiä ominaisuuksia ovat hapen sietokyky, bakteriosiinien tuotanto sekä tarttuminen ja kolonisaatio hampaan pinnalle (Esberg ym. 2017). Glukosyyliitransferaaseilla on myös keskeinen asema virulentin plakin kehityksessä (Bowen ja Koo 2011). *S. mutans* tuottaa glukosyyliitransferaasi-entsyymiä, joka syntetisoi sakkaroosista vesiliukoisia tai liukenemattomia glukaaneja (Devulapalle ja Mooser 2001). Glukosyyliitransferaasit adsorboituvat hampaan kiilteeseen, syntetisoivat glukaaneja ja tarjoavat mikro-organismeille paikan kolonisaatiolle sekä liukenemattoman matriksin plakille (Bowen ja Koo 2011).

Mikä tahansa hiilihydraatti, jota plakin happoa tuottavat bakteerit pystyvät hyödyntämään energianlähteenä, edistää mikrobien virulenssia ja on siten kariogeeninen. Sakkaroosi muutetaan nopeasti happamiksi lopputuotteiksi ja on myös ainoa ravinnon hiilihydraatti, joka voidaan muuttaa solunulkoisiksi polysakkarideiksi plakissa. (Forssten ym. 2010.) Nämä solunulkoiset polysakkaridit edistävät biofilmin kehittymistä toimimalla tarttumisalustana muille bakteereille ja suojaamalla biofilmiä ympäristöltä, kuten syljen huuhtelevalta vaikutukselta (Bowen ym. 2018). *S. mutans*'n erityinen rooli kariksen etiologiassa on ajateltu olevan biofilmin matriksin muodostaminen (Bowen 2016). Lisäksi *S. mutans* voi tarttua kiilteen sylkipellikkeliin sekä muihin plakin bakteereihin ja on voimakas hapon tuottaja (Forssten ym. 2010).

Kariksen syntyyn liittyy oleellisesti sokerin käyttö, joka happamoittaa plakkia. Tällöin suussa yleistyy happamassa viihtyvät ja happoa tuottavat lajit, joista *S. mutans* on tunnetuin. Elämäntavat, sylki ja suun bakteerit ennustavat kuitenkin rajallisesti kariksen

kehittymistä. *S. mutans*'n tietyt adhesiinalatyypit selittävät yksilötason eroja kariuksen kehittymisessä. (Esberg ym. 2017.) SpaP ja Cnm ovat *S. mutans*'n pintaproteiineja ja niillä on vaikutusta kolonisaatioon ja tiettyjen alatyypin esiintyminen suussa lisää kariuksen kehittymisen todennäköisyyttä (Avilés-Reyes ym. 2017).

*S. mutans* omaa neljä kliinistä serotyyppiä, jotka ovat c, e, f ja k. Serotyypeistä c ja e ovat yleisimmät suussa, ja niillä on ainutlaatuiset glukoosisivuketjusidokset. Tutkimusten mukaan serotyyppi c liittyy merkittävästi kariuksen kehittymisen ennustamiseen. *S. mutans*'n kliinisten cnm+-isolaattien yleisyys on noin 10–20 %, ja ne ovat tyypillisesti serotyyppiä k. Myös cbm+-kannat ovat useimmiten serotyyppiä k ja niiden yleisyys on 2 %. (Momeni ym. 2019.)

Bakteeribiofilmejä tutkitaan monin eri tavoin. Mikroitiitterilevy menetelmä on yleinen biofilmin kasvua mitattaessa. Biofilmiä kasvatetaan mikroitiitterilevyssä pienessä tilavuudessa ja arvioidaan sen muodostumista käyttämällä erilaisia menetelmiä, kuten värjäystä. Menetelmällä voidaan seuloa antimikrobisia yhdisteitä, arvioida biofilmin muodostuskykyä ja eri tekijöiden vaikutusta biofilmin muodostumiseen. (Allkja ym. 2021.) xCELLigence-menetelmä on impedanssipohjainen biosensorijärjestelmä, jolla voidaan reaaliaikaisesti seurata solujen elinkelpoisuutta, siirtymistä, kasvua, leviämistä ja lisääntymistä RTCA E-levyjen pohjalla olevan mikroelektroniikan avulla. (Stefanowicz-Hajduk ym. 2016.)

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli testata uutta fluoresoiviin pH herkkiin väriaineisiin perustuvaa menetelmää biofilmin pH:n muutosten seuraamiseksi biofilmin muodostuksen aikana (Optical pH Sensors for Contactless or Minimally Invasive Measurements. PreSens. [www.presens.de](http://www.presens.de)) ja verrata saatua informaatiota perinteisellä mikroitiitterilevy testillä ja biofilmin reaaliaikaisella seurannalla saatuun informaatioon biofilmin määrästä ja muodostumisnopeudesta. Malliorganismina käytettiin kariogeenistä *S. mutans* bakteeria, serotyyppiä c. Bakteerien biofilmin muodostumista tutkittiin Brain Heart Infusion (BHI) -kasvatusliuoksessa ja syljessä, sakkaroosin läsnä ollessa. pH-mittausmenetelmän toimiessa sen avulla saadaan ainutlaatuista tietoa pH:n muutoksista biofilmin sisällä biofilmin kehityksen aikana.

## 2 TUTKIMUSMENETELMÄT

Tässä tutkimuksessa tutkittiin in vitro *S. mutans*'n muodostamaa biofilmiä kolmella eri menetelmällä: värjäämällä mikrotiitterilevyllä kasvatettua biofilmiä, seuraamalla pH:n muutoksia biofilmin kehittymisen aikana sekä seuraamalla biofilmin muodostumista (määrää ja tarttumista) reaaliaikaisesti. Samat menetelmät toistettiin *S. mutans*'n kolmella eri kannalla (*S. mutans* NCTC 10449, *S. mutans* Ingbritt ja *S. mutans* CI2366).

Biofilmien annettiin muodostua BHI-elatusaineliuoksessa (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company) ja pastöroidussa syljessä, sakkaroosin läsnä ollessa. Käytetyt sakkaroosipitoisuudet biofilmin muodostuksessa olivat 0 %, 0,1 %, 0,5 % ja 1 %. Tutkimuksissa käytetyt sakkaroosiliuokset valmistettiin 20 %:sta sakkaroosiliuoksesta (D(+)-Saccharose, VWR Chemicals) ja natriumkloridiliuoksesta (NaCl, 9 mg/ml Baxter). Työssä käytettiin kolmea eri pitoisuuksiltaan olevaa sakkaroosiliuosta (0,4 %, 2 % ja 4 %), jotta saatiin kasvatusalustalle aiemmin mainitut pitoisuudet. Liuosten valmistus on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1. Sakkaroosiliuosten valmistus.

	20 % sakkaroosi	NaCl
0,4 %	20 µl	980 µl
2 %	100 µl	900 µl
4 %	200 µl	800 µl

Tutkimuksessa käytetty sylki oli seitsemältä koehenkilöltä kerättyä, pastöroitua parafiini stimuloitua kokosylkeä.

### 2.1 Mikrotiitterilevybiofilmi tutkimus

Mikrotiitteritutkimus aloitettiin bakteerien kasvatuksella. BHI otettiin puoli tuntia ennen bakteerien siirrostusta huoneenlämpöön. Sitä pipetoitiin 5 ml koeputkeen sekä 5 µl sulatettua ja vorteksoitua bakteeristokkiliuosta, joka oli säilytetty -20 °C:ssa. Bakteerit laitettiin kasvamaan yön yli 37 °C:een lämpökaappiin. Mikrotiitteritutkimuksessa käytettiin 96 kuopan Costar-merkin steriiliä kuoppalevyä.

Seuraavana päivänä valmistettiin eri kasvatusliuokset biofilmille. Yön yli lämpökaapissa kasvanut bakteeriliuos vorteksoitiin ja kaadettiin sentrifuugiputkeen. Bakteerit

sentrifugoitiin pohjaan (Eppendorf centrifuge 5810R, 10 min, 12857 g) ja pestiin kerran 5 ml 0,9 % NaCl-liuoksella. Pesun jälkeen pelletti suspensoitiin 5 ml NaCl:a. Bakterisuspension valmistusta varten määritettiin spektrofotometrillä (Shimadzu BioSpec-mini) nollataso laittamalla kyvetiin NaCl:a aallonpituudella 550 nm. Uuteen koeputkeen laitettiin muutama millilitra NaCl:a ja muutama tippa pestyä bakteeriliuosta. Liuoksen pitoisuutta säädettiin niin, että bakterisuspension absorbanssi oli noin 0,05. Kuoppalevyn (Costar 96) kuopat täytettiin siten, että saatiin kuusi vierekkäistä kuoppaa ja yhteensä kahdeksan riviä, eli yhteensä 48 kuoppaa. Jokaiseen kuoppaan laitettiin 50 µl bakterisuspensiota. Neljään ensimmäiseen riviin laitettiin 100 µl BHI:ta ja neljään jälkimmäiseen 100 µl pastöroitua sylkeä. Ensimmäiseen riviin laitettiin 50 µl NaCl:a, toiseen 0,4 % sakkaroosiliuosta, kolmanteen 2 % ja neljanteen 4 %. Sama toistettiin sylkeä sisältävissä riveissä. Sakkaroosiliuosta laitettiin kuoppiin 50 µl, jolloin yhden kuopan lopputilavuus oli 200 µl. Kuoppien täyttö on kuvattu taulukossa 2. Kuoppalevy vietiin täytön jälkeen vuorokaudeksi hiilidioksidikaappiin (37 °C).

Taulukko 2. Kuoppien täyttö mikrotiitteritutkimuksessa.

	1	2	3	4	5	6						
<b>A</b>							50 µl NaCl					
<b>B</b>							100 µl BHI	50 µl bakterisus.				50 µl 0,4 % sakk.
<b>C</b>												50 µl 2 % sakk.
<b>D</b>												50 µl 4 % sakk.
<b>E</b>							50 µl NaCl					
<b>F</b>							100 µl sylkeä	50 µl bakterisus.				50 µl 0,4 % sakk.
<b>G</b>												50 µl 2 % sakk.
<b>H</b>												50 µl 4 % sakk.

Viimeinen vaihe, eli biofilmin värjäys, tehtiin crystal violet -värjäyksellä. Kuoppien sisältö tyhjennettiin ja kuoppalevyn kuopat pestiin kaksi kertaa 1 x PBS:llä (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco), jota laitettiin 200 µl/kuoppa. Kuoppiin laitettiin 100 µl metanolia (Methanol for analysis, Merck) ja annettiin vaikuttaa 15 minuuttia. Metanoli poistettiin ja kuoppalevyä kuivatettiin 10 minuuttia kansi avoinna. Kuoppalevyn jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 100 µl 0,1 %:sta crystal violet -väriä ja poistettiin se 15 minuutin kuluttua. Kuoppien pesu suoritettiin uudelleen kuten aiemmin, ja taputeltiin



kuoppalevyä kuivaksi paperia vasten pesujen välillä ja jälkeen. Jokaiseen kuoppaan laitettiin 200 µl 33 %:sta etikkahappoliuosta (Acetic acid glacial 100 %, Merck) ja annettiin taas vaikuttaa 15 minuuttia. Viimeiseksi mitattiin spektrofotometrillä (Thermo Scientific Multiskan FC) biofilmin absorbanssit käyttäen aallonpituutta 569 nm.

## 2.2 Biofilmin määrä ja tarttuminen

Biofilmin määrää ja tarttumista mitattiin xCELLigence-laitteella (ACEA xCelligence Real-Time Cell Analyzer, Agilent), jonka avulla voidaan seurata biofilmin muodostumista reaaliaikaisesti. Laitteessa on elektronisesti integroitu Boyden-kammio, jolla saadaan sähköisen impedanssin kautta tietoa solujen invaasiosta ja migraatiosta. Kuoppalevynä käytettiin muovista 16-kuopan E-Plate 16 PET kuoppalevyä (E-Plate 16 PET, Agilent). Bakterisuspensio valmistettiin kuten aiemmissa tutkimuksissa. Kuoppalevyyn täytettiin ensin vain syljet ja BHI ja tehtiin levyn taustamittaus lukulaitteella. Kuoppiin laitettiin vielä bakterisuspensio ja sakkaroosiliuokset taulukon 3 mukaan.

Taulukko 3. Kuoppien täyttö biofilmin määrän ja tarttumisen tutkimisessa.

	1	2		
<b>A</b>			50 µl NaCl	
<b>B</b>			100 µl BHI	50 µl 0,4 % sakk.
<b>C</b>			50 µl bakterisus.	50 µl 2 % sakk.
<b>D</b>				50 µl 4 % sakk.
<b>E</b>			50 µl NaCl	
<b>F</b>			100 µl sylkeä	50 µl 0,4 % sakk.
<b>G</b>			50 µl bakterisus.	50 µl 2 % sakk.
<b>H</b>				50 µl 4 % sakk.

Kuoppalevy vietiin inkubaattorissa olevaan lukijaan 15 minuutin jälkeen. Biofilmin muodostumista seurattiin vuorokauden ajan.

## 2.3 pH:n seuranta

pH:n tutkimista varten bakterisuspensio valmistettiin kuten yllä. Ennen kuoppien täyttämistä kuoppalevy vietiin inkubaattorissa olevaan PreSens-mittarin (PreSens SDR SensorDish Reader) lukulaitteelle ja säädettiin laitteen asetukset. Tässä käytettiin SDR

SensorDish Reader 24-kuopan kuoppalevyä (PreSens Inc), jossa jokaisen kuopan pohjassa on integroituna esikalibroitu pH-anturit, joita PreSens-mittari lukee. Kuoppien täyttö on havainnollistettu taulukossa 4.

Taulukko 4. Kuoppien täyttö pH-tutkimuksessa.

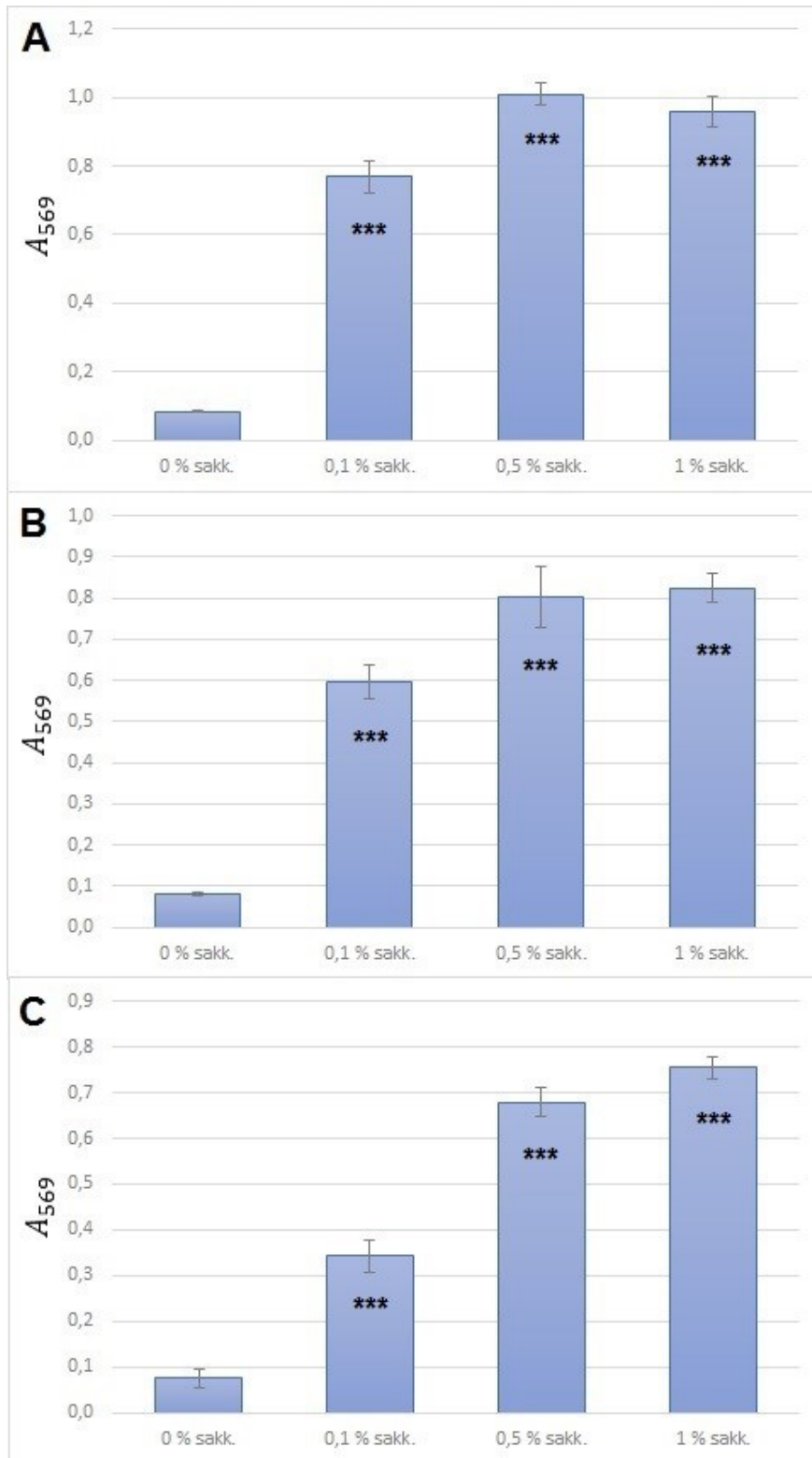
	1	2	3	4	5	6			
<b>A</b>							125 µl NaCl		
<b>B</b>							250 µl BHI	250 µl sylkeä	125 µl 0,4 % sakk.
<b>C</b>							125 µl bakteerisuus.	125 µl bakteerisuus.	125 µl 2 % sakk.
<b>D</b>									125 µl 4 % sakk.

Kuoppalevy vietiin inkubaattoriin 20 minuutiksi ja levy asetettiin lukijaan. Laitteen annettiin seurata pH:n muutosta vuorokauden, ja lopuksi biofilmin kasvatusmediumin pH mitattiin vielä manuaalisesti pH-elektrodilla (Radiometer MeterLab PHM210).

### 3 TULOKSET

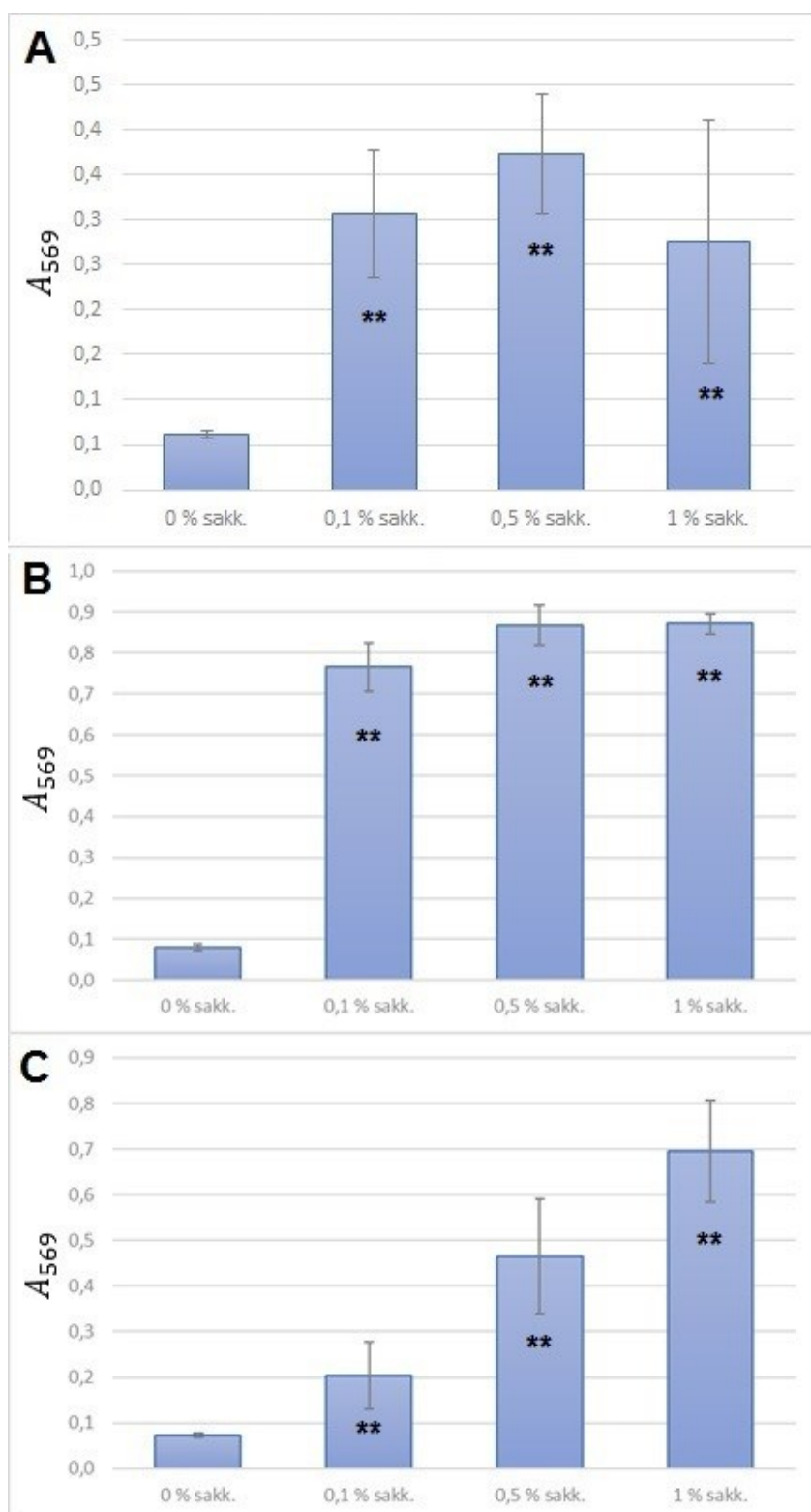
#### 3.1 Mikroitiitterilevybiofilmi tutkimus

Mikroitiitterilevybiofilmi tutkimuksessa BHI-elatusaineliuoksessa muodostuneiden *S. mutans* kantojen biofilmien absorbanssien keskiarvot ovat kuvattuina kuvassa 1. Jo pieni sakkaroosin lisäys nostaa absorbanssia kaikissa kannoissa (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,001$ ). Kaikilla kannoilla oli lisäksi merkitsevästi eroa 0,1 % ja 0,5 % sekä 0,1 % ja 1 % sakkaroosiliuosten välillä (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,001$ ).



Kuva 1. Biofilmi mikrotiitterilevyllä. *S. mutans*'n kantoja (*S. mutans* Ingbritt (A), *S. mutans* CI2366 (B) ja *S. mutans* NCTC 10449 (C)) kasvatettiin BHI-mediumissa eri sakkaroosipitoisuuksissa 24 tuntia. Muodostunut biofilmi värjättiin kristallivioletilla. Eri sakkaroosipitoisuuksissa ja pelkässä BHI:ssa muodostuneen biofilmin absorbanssien välillä on tilastollisesti merkitsevä ero (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).

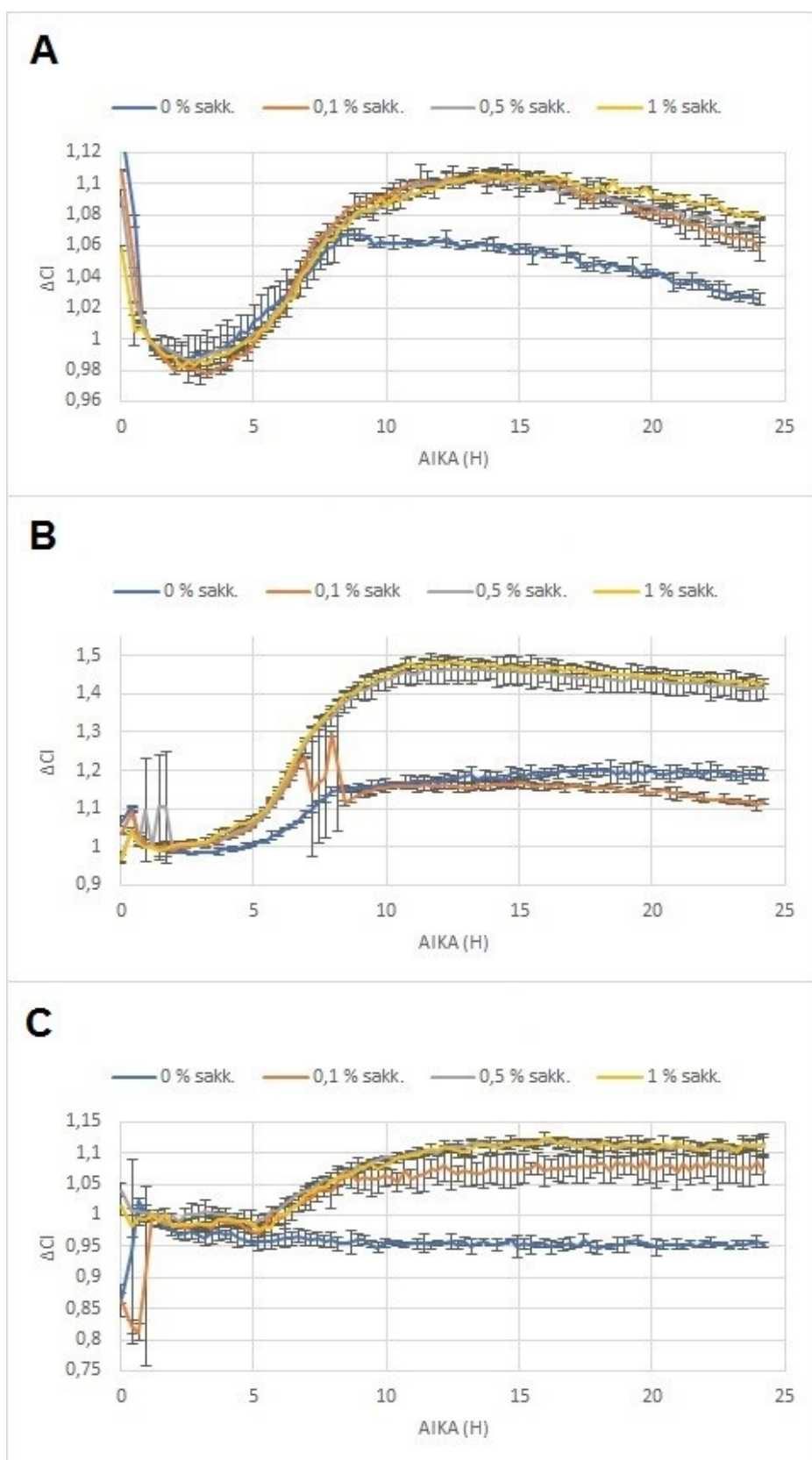
Kuvassa 2 on esitetty mikrotiitteritutkimuksella saadut kristallivioletilla värjätyt biofilmiä määrittävät, kun bakteereja kasvatettiin BHI:n sijaan eri sakkaroosipitoisuuksissa syljessä. Kaikissa kannoissa huomataan absorbanssin nousu jo pienestä määrästä (0,1 %) sakkaroosia (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,01$ ). Eri sakkaroosipitoisuuksien välillä ei ollut merkittävää eroa, paitsi *S. mutans* NCTC 10449:n tapauksessa (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,01$ ). *S. mutans* Cl2366:n sakkaroosipitoisuuksissa oli myös eroa 0,1 %:n ja 0,5 %:n sekä 0,1 %:n ja 1 %:n välillä, ja biofilmiä tuotettiin merkittävästi enemmän sakkaroosipitoisuuden kasvessa (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,01$ ).



Kuva 2. Biofilmi mikrotiitterilevyllä. *S. mutans*'n kantoja (*S. mutans* Ingbritt (A), *S. mutans* CI2366 (B) ja *S. mutans* NCTC 10449 (C)) kasvatettiin pastöroidussa syljessä eri sakkaroosipitoisuuksissa 24 tuntia. Muodostunut biofilmi värjättiin kristallivioletilla. Eri sakkaroosipitoisuuksissa ja pelkässä syljessä muodostuneen biofilmin absorbanssien välillä on tilastollisesti merkitsevä ero (\*\*=  $p < 0,01$ ).

### 3.2 Biofilmin määrä ja tarttuminen

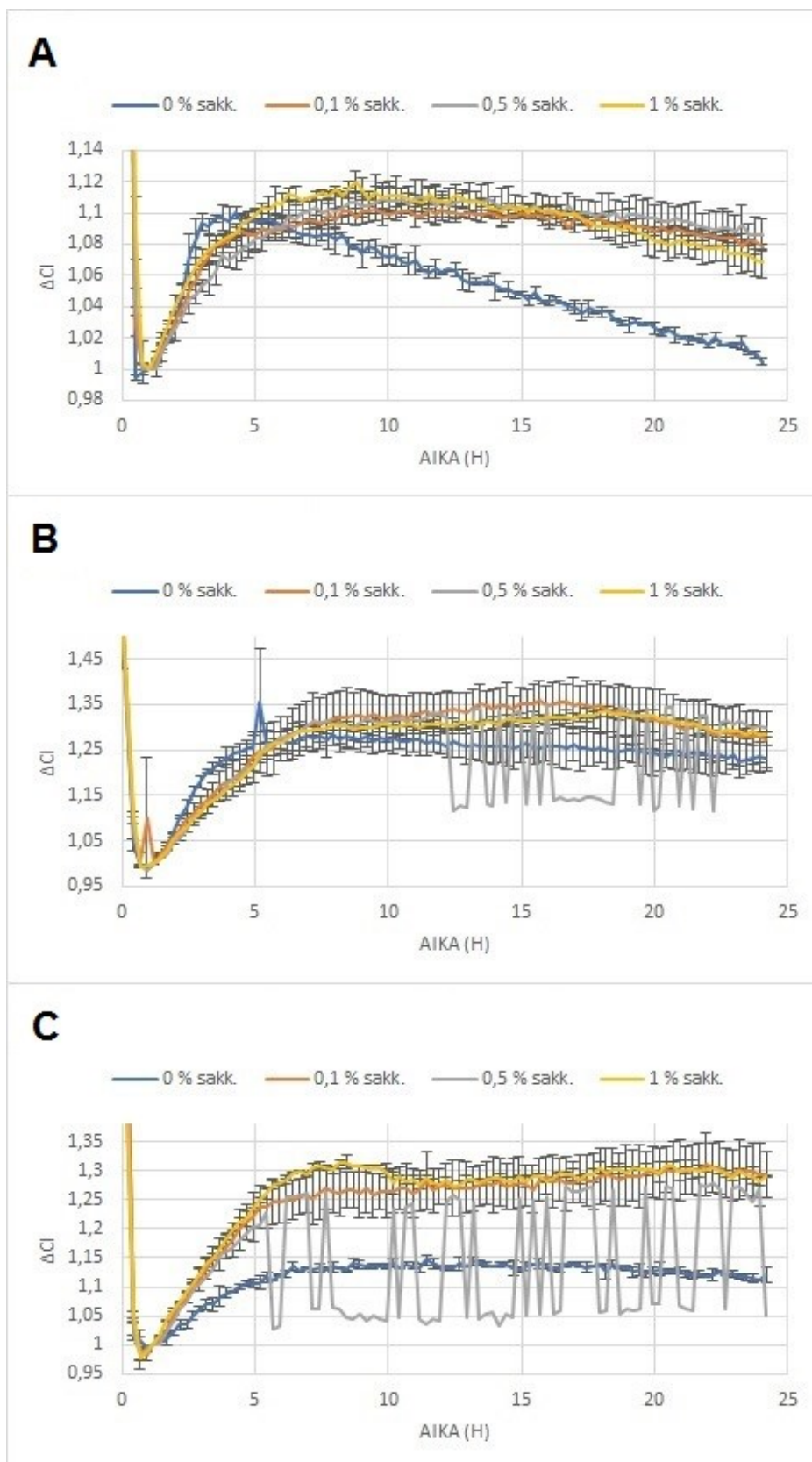
Biofilmin määrän ja tarttumisen tulokset xCELLigence-laitteella mitattuna on esitetty kuvassa 3, kun biofilmejä kasvatettiin BHI:ssa. 0,1 %:ssa ja 0,5 %:ssa sakkaroosiliuosien käyrissä näkyy yksittäisiä poikkeamia (kuvat 3 ja 4). Ne johtuvat mitä ilmeisimmin mittalaitteiston häiriöistä. Kaikki kannat tuottivat biofilmiä mitattavia määriä, ja sakkaroosi lisäsi biofilmin tuottoa tilastollisesti merkitsevästi (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,001$ ). *S. mutans* Cl2366:n tapauksessa 0,1 % sakkaroosiliuos ei vaikuttanut merkittävästi, mutta suuremmat pitoisuudet sakkaroosia lisäsivät biofilmin määrää ja tarttumista. Eri sakkaroosipitoisuuksien välillä ei ollut merkittävää eroa.



Kuva 3. Biofilmin määrän ja tarttumisen mittaaminen. *S. mutans*'n kantojen (*S. mutans* Ingbritt (A), *S. mutans* CI2366 (B) ja *S. mutans* NCTC 10449 (C)) annettiin kasvaa BHI-elatusaineliuoksessa vuorokauden ajan eri sakkaroosipitoisuuksissa.



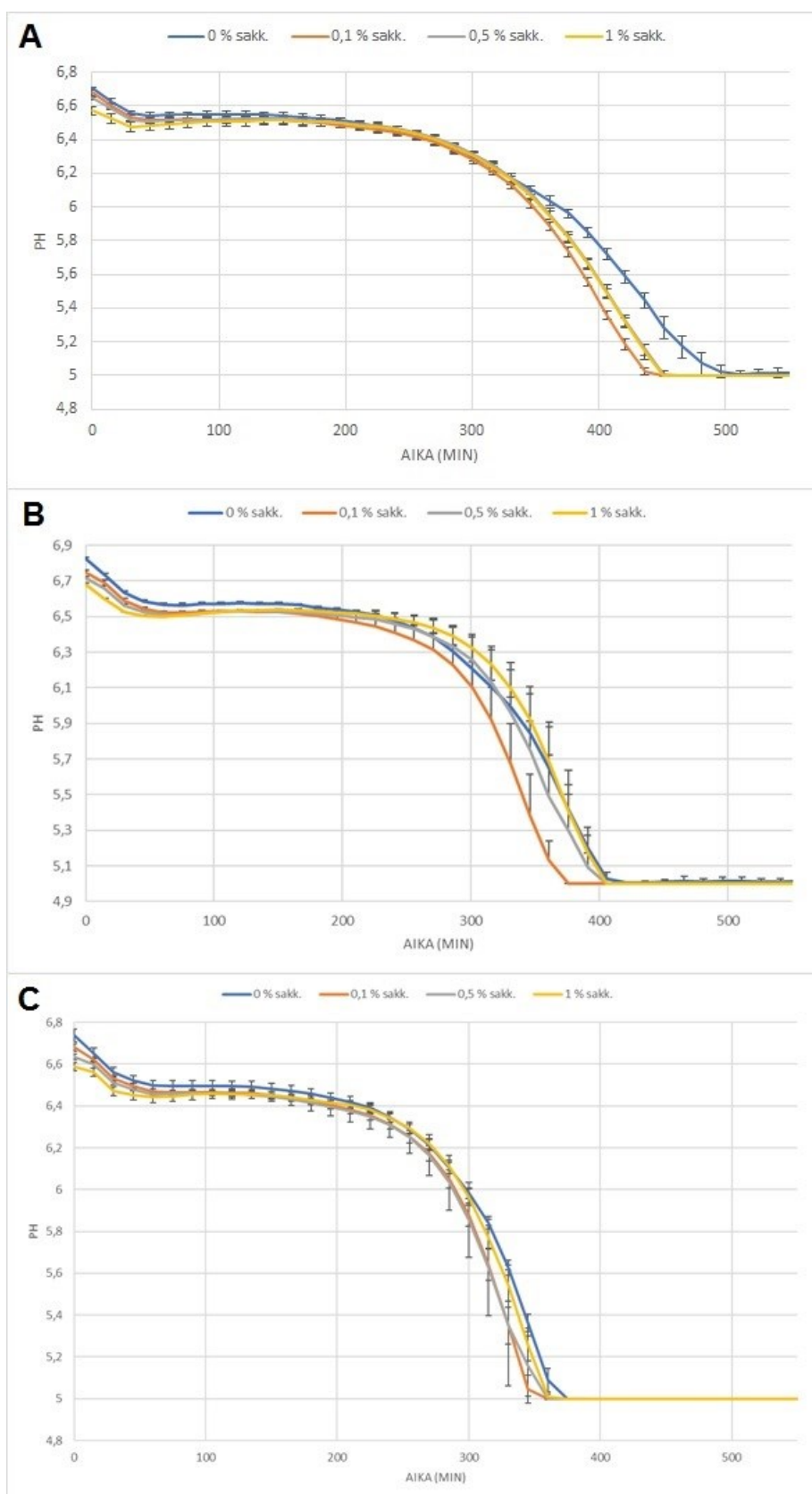
Syljessä kasvatettujen kantojen biofilmin määrän ja tarttumisen tulokset xCELLigence-laitteella mitattuna on esitetty kuvassa 4. *S. mutans* Ingbritt:n kohdalla sakkaroosin lisääminen vaikutti merkitsevästi biofilmin määrään kaikilla pitoisuuksilla (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,01$ ). Pitoisuuksien välillä ei ollut merkittävää eroa. *S. mutans* CI2366 ja NCTC 10499 kantojen biofilmin määrä nousi merkitsevästi, kun ne kasvoivat 0,1 % ja 1 % sakkaroosiliuoksissa (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,05$ ). 0,1 % ja 0,5 % sekä 0,5 % ja 1 % sakkaroosiliuosten välillä oli tilastollisesti merkittävä ero kummassakin kannassa (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,01$ ).



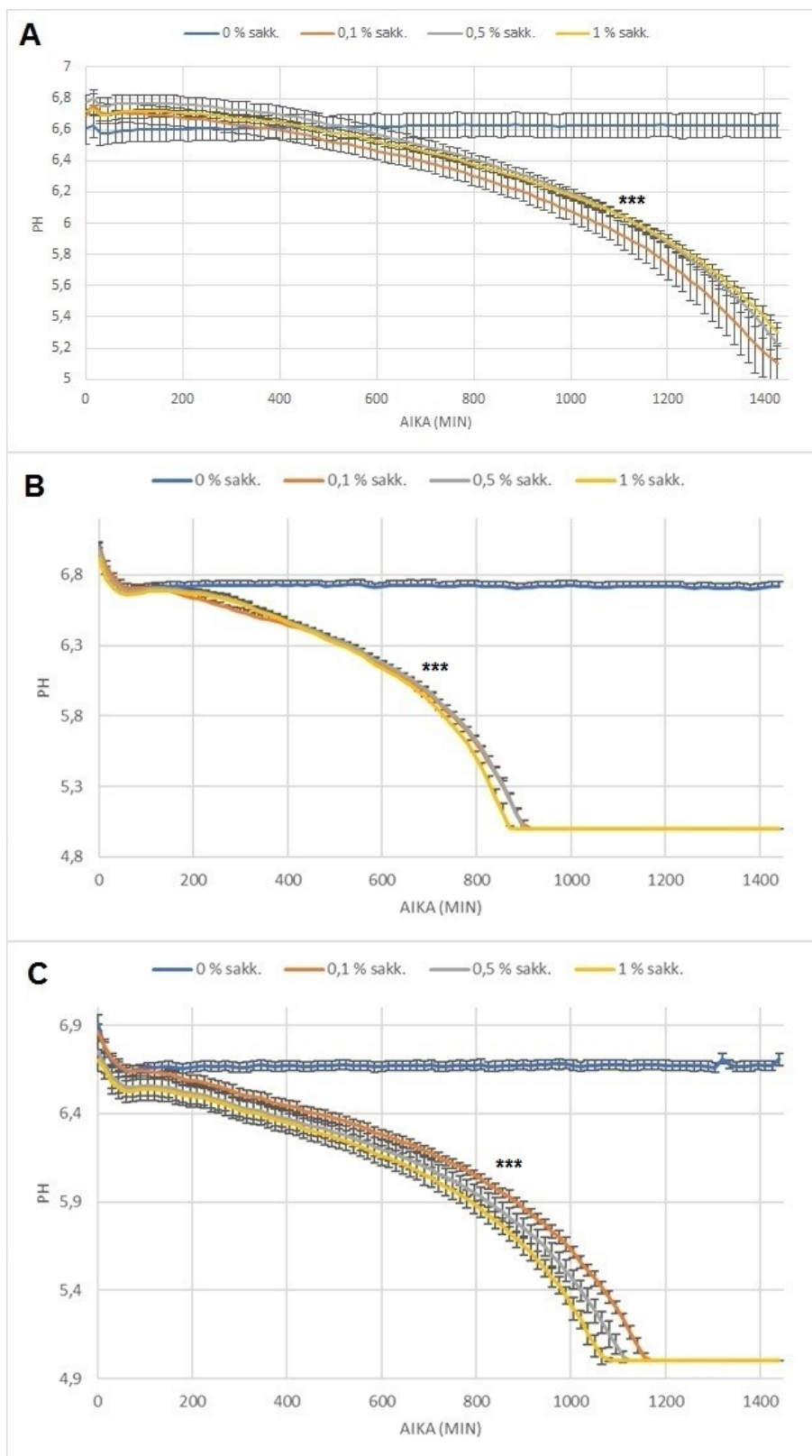
Kuva 4. Biofilmin määrän ja tarttumisen mittaaminen. *S. mutans*'n kantojen (*S. mutans* Ingbritt (A), *S. mutans* CI2366 (B) ja *S. mutans* NCTC 10449 (C)) annettiin kasvaa pastöroidussa syljessä vuorokauden ajan eri sakkaroosipitoisuuksissa.

### 3.3 pH:n seuranta

Kuvissa 5 ja 6 on esitetty pH-tutkimuksen tulokset biofilmin muodostuessa BHI:ssa ja syljessä. 0,1 %, 0,5 % ja 1 % sakkaroosiliuoksissa muodostuneen biofilmin pH laski biofilmin sisällä alle 5, joka on PreSens laitteen mittaamisminimi. Kyseisten tulosten kohdalle on kuvaajissa 5 ja 6 B-C merkitty pH:ksi tasan 5. Seurannan aikana kaikissa kasvatuksissa pH laski alle 5:n, mutta pH:n muutoksen nopeudessa havaittiin eroja. *S. mutans* Ingbritt:n kohdalla sakkaroosi lisäsi bakteerien hapontuottoa BHI:ssa siten, että 360 minuutin kohdalla pH oli kaikissa sakkaroosia sisältävissä kasvatusmediumeissa merkittävästi alhaisempi kuin ilman sakkaroosia olevissa kasvatuksissa.



Kuva 5. pH:n seuranta PreSens laitteella. *S. mutans* Ingbritt:n (A), *S. mutans* CI2366:n (B) ja *S. mutans* NCTC 10449:n (C) annettiin kasvaa vuorokauden ajan BHI:ssa eri pitoisuuksissa sakkaroosia.



Kuva 6. pH:n seuranta PreSens laitteella. *S. mutans* Ingbritt:n (A), *S. mutans* CI2366:n (B) ja *S. mutans* NCTC 10449:n (C) annettiin kasvaa vuorokauden ajan syljessä eri pitoisuuksissa sakkaroosia. Sakkaroosin läsnä ollessa pH laski kaikissa kannoissa merkittävästi (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

Biofilmin kasvatusmediumin pH mitattiin manuaalisesti pH-elektrodilla pH-tutkimuksen päätteeksi. Mittauksen tulokset on kuvattu taulukossa 5. Kaikkien kantojen kasvatusmediumin pH oli BHI-kasvatuksen jälkeen alempi kuin sylkikasvatuksen jälkeen. Jo vähäinen (0,1 %) sakkaroosin lisäys laski pH:ta huomattavasti molemmissa kasvatusmediumeissa (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,001$ ). Eri sakkaroosipitoisuuksien välillä ei ole merkittävää eroa *S. mutans* Ingbritt-kannassa syljessä kasvatettuna. Muissa kannoissa pitoisuuksien välillä oli merkittävä ero kummassakin kasvatusalustassa kasvatettuna (kaksisuuntainen t-testi, yhtä suuret varianssit;  $p < 0,05$ ) lukuun ottamatta *S. mutans* NCTC 10499; 0,5 % ja 1 % sakkaroosiliuosten välillä ei ollut merkittävää eroa.

Taulukko 5. Biofilmin kasvatusmediumin pH-manuaalimittauksen tulokset. *S. mutans* Ingbritt:n (rivit A-D), *S. mutans* CI2366:n (rivit E-H) ja *S. mutans* NCTC 10449:n (rivit I-L) annettiin kasvaa BHI-elatusaineliuoksessa ja syljessä eri pitoisuuksissa sakkaroosia 24 tuntia, minkä jälkeen pH mitattiin manuaalisesti pH-elektrodilla.

	1	2	3	4	5	6	
<b>A</b>	5,3	5,3	5,3	7,6	7,7	7,8	0 % sakk.
<b>B</b>	4,5	4,5	4,5	5,7	6,0	5,9	0,1 % sakk.
<b>C</b>	4,2	4,2	4,2	6,0	5,9	5,8	0,5 % sakk.
<b>D</b>	4,3	4,2	4,2	5,9	5,9	6,0	1 % sakk.
<b>E</b>	5,2	5,2	5,2	7,7	7,8	7,9	0 % sakk.
<b>F</b>	4,5	4,5	4,5	4,6	4,6	4,6	0,1 % sakk.
<b>G</b>	4,0	4,0	4,0	4,6	4,6	4,5	0,5 % sakk.
<b>H</b>	4,0	4,0	4,0	4,5	4,5	4,5	1 % sakk.
<b>I</b>	5,2	5,2	5,3	7,6	7,7	7,7	0 % sakk.
<b>J</b>	4,5	4,5	4,5	5,0	5,1	5,1	0,1 % sakk.
<b>K</b>	4,0	4,0	4,0	5,0	5,0	5,0	0,5 % sakk.
<b>L</b>	4,0	4,0	4,0	4,9	4,9	4,9	1 % sakk.

BHI

sylki

#### 4 JOHTOPÄÄTÖKSET

Syljen läsnä ollessa biofilmiä muodostui vähemmän kuin pelkässä BHI:ssa kasvatettuna paria poikkeusta lukuun ottamatta. Syljellä on monia tärkeitä toimintoja, kuten puskurina toimiminen ja sopivan pH:n ylläpitäminen suun mikrobistolle (Marsh 2018). Lisäksi se sisältää paljon antimikrobisia aineita (Lenander-Lumikari ja Loimaranta 2000). Tämä saattaa selittää miksi biofilmiä muodostui useimmiten syljessä vähemmän kuin BHI:ssa, joka on bakteerien kasvamista edistävä ravintorikas medium. Syljellä on suussa huuhteleva vaikutus toisin kuin mikrotiitterilevyllä, jossa näyte on paikallaan.

Sylki myös hidasti pH:n laskua, mikä ilmenee taulukosta 6. *S. mutans* Ingbritt:n biofilmin sisäinen pH ei syljessä laskenut tutkimuksen aikana alle 5:n, vaan jäi pH 5,3:een. Tätä syljen vaikutusta biofilmin sisäisen pH:n laskuun selittää mm sen puskurikapasiteetti (Forssten ym. 2010).

Taulukko 6. Yhteenveto tuloksista biofilmiä muodostuessa BHI:ssa (rivit 1–3) ja syljessä (rivit 4–6) 1 % sakkaroosiliuoksessa.

		Absorbanssi*	max dCI**	Aika (h)***
1	<b><i>S. mutans</i> Ingbritt</b>	0,96	1,1	7,5
2	<b><i>S. mutans</i> CI2366</b>	0,83	1,5	6,8
3	<b><i>S. mutans</i> NCTC 10449</b>	0,76	1,1	6,3
4	<b><i>S. mutans</i> Ingbritt</b>	0,28	1,1	>24
5	<b><i>S. mutans</i> CI2366</b>	0,87	1,3	14,8
6	<b><i>S. mutans</i> NCTC 10449</b>	0,70	1,3	18,3

\* kristallivioletti värjäyksessä mitattu muodostuneen biofilmin absorbanssi

\*\* xCELLigence levyllä mitattu suurin CI arvo

\*\*\* aika, joka kului pH 5 saavuttamiseen

pH tutkimuksessa huomattiin, että kasvatusalustalla oli merkitystä pH:n laskuun: ilman sakkaroosia pH ei laskenut merkittävästi syljessä kasvatettuna, kun taas BHI:ssa kasvatettuna pH laski. Tätä selittää se, että *S. mutans* tuottaa happoa, vaikka biofilmiä ei muodostuisikaan. Biofilmin muodostumiseen tarvitaan sakkaroosia, mutta hapon tuotantoon riittää BHI:ssa oleva glukoosi. Syljessä ei ole vapaita hiilihydraatteja, koska pH

ei laskenut. *S. mutans* -kannat tuottavat sakkaroosista liukenemattomia glukaaneja, joita ne erittävät solun ulkopuolelle. Nämä solunulkoiset polysakkaridit edistävät biofilmin kehittymistä toimimalla tarttumisalustana muille bakteereille ja suojaamalla biofilmiä ympäristöltä, kuten syljen huuhtelevalta vaikutukselta. (Bowen ym. 2018.)

Mikroitiitteri- ja xCELLigence menetelmillä ei havaittu kasvatusalustan tuomaa vaikutusta niin selkeästi kuin pH tutkimuksessa havaittiin. Biofilmin määrää mittaavissa tutkimuksissa havaittiin, että biofilmiä ei muodostunut merkittävästi kummassakaan kasvatusalustassa ilman sakkaroosia. Myös nopeuksissa havaittiin eroja xCELLigence menetelmän ja pH tutkimuksen välillä. pH laski nopeammin BHI:ssa kuin syljessä kaikissa kannoissa, mutta biofilmin määrän ja tarttumisen muutoksissa ei havaittu yhtä selkeää eroa kasvatusalustojen välillä. Kaikissa kolmessa tutkimusmenetelmässä sakkaroosin lisääminen vaikutti biofilmiin. Aiempien tutkimusten mukaan sakkaroosi lisäsi eniten *S. mutans*'n biofilmin kasvua verrattuna monosakkarideihin tehostaen solunulkoisten polysakkaridien erittymistä (Zhou ym. 2018).

xCELLigence menetelmällä saadaan reaaliaikaista tietoa biofilmin määrästä ja tarttumisesta, kun taas mikroitiitteri tutkimus kertoo biofilmin määrän tutkimuksen lopussa. xCELLigence menetelmä kertoo siten tarkemmin, miten biofilmin määrä muuttuu tutkimuksen aikana ja eri kantojen käyttäytymisestä. Mikroitiitteri tutkimus sekä biofilmin tutkiminen xCELLigence menetelmällä osoittavat, että sakkaroosin vaikutuksesta biofilmin määrä ja tarttuminen lisääntyvät molemmissa kasvatusalustoissa. Tämä oli odotettavissa oleva tulos, koska sakkaroosin läsnä ollessa glukosyyli transferaasit tuottavat muun muassa glukaaneja, jotka edesauttavat biofilmin muodostumista (Avilés-Reyes ym. 2017). Pienikin sakkaroosipitoisuus vaikuttaa biofilmin määrään kasvattavasti. *S. mutans* hyödyntää sakkaroosia ravinnonlähteenään muuttaen sen happamiksi lopputuotteiksi (Forssten ym. 2010). Nämä tekijät vaikuttavat siihen, miksi biofilmiä muodostui enemmän sakkaroosin läsnä ollessa.

Mikroitiitterilevybiofilmi tutkimuksessa määritetty absorbanssi on suoraan verrannollinen biofilmin määrään. Mitä suurempi on absorbanssi sitä enemmän biofilmiä on muodostunut. Sakkaroosipitoisuuden kasvattaminen lisäsi biofilmin määrää kaikissa kannoissa molemmissa kasvatusalustoissa, lukuun ottamatta *S. mutans* Ingbritt:ä, jonka tapauksessa 1 % sakkaroosipitoisuudessa kasvaneen biofilmin määrä oli pienempi kuin 0,5 % sakkaroosipitoisuudessa kasvaneen. Havaittu ero voi viitata siihen, että



biofilmiä on muodostunut 1 % sakkaroosin läsnä ollessa niin runsaasti, että osa siitä irtoaa ennen määrittystä tehtävissä pesuissa eikä siksi ole enää mitattavissa.

Eri kantojen välillä oli vaihtelua biofilmien määrissä sekä BHI:ssa että syljessä muodostuneiden biofilmien osalta. *S. mutans* Ingbritt:n biofilmin määrät olivat suurimmat BHI:ssa ja *S. mutans* NCTC 10499 pienimmät. Syljessä muodostuneiden biofilmien määrät olivat suurimmat *S. mutans* CI2366:lla ja pienimmät *S. mutans* Ingbritt:llä. *S. mutans* NCTC 10499:lla oli pienin muutos biofilmin määrän kasvussa 0,1 % sakkaroosipitoisuuden lisäämisellä pelkän kasvatusalustan biofilmin määrään verrattuna. *S. mutans*'n eri kannat näin ollen eroavat toisistaan in vitro virulenssiaktiivisuuksien suhteen. Myös Liun ym. (2021) tutkimusten mukaan *S. mutans*'n kannat poikkeavat toisistaan ja *S. mutans* biofilmin biomassassa oli korkeampi ECC (early-childhood caries) lapsilla kuin niillä, joilla ei esiintynyt kariesta.

Biofilmin määrän ja tarttumisen mittaamisella selvitettiin reaaliajassa, kuinka paljon ja tiukasti mittauslevyn pohjan päälle on tarttunut biofilmiä, mitä kuvaa xCELLigence-laitteen mittausyksikkö cell index (CI). Gutiérrezin ym. (2016) tutkimusten mukaan kasvatusalustan sisältäessä sakkaroosia *S. mutans*'n biofilmin määrä ja tarttuminen lisääntyivät, mutta BHI:ssa kasvatettuna ne eivät nousseet merkittävästi. Tässä tutkimuksessa havaittiin sama sakkaroosin tuoma vaikutus.

*S. mutans* CI 2366:n biofilmin muodostuminen oli poikkeavaa eri kasvatusalustoilla xCELLigence menetelmän perusteella. BHI:ssa muodostuneen biofilmin määrä oli suurempi kuin 0,1 % sakkaroosipitoisuudessa. Lisäksi 1 % ja 0,5 % sakkaroosipitoisuuksissa muodostuneiden biofilmien määrät olivat huomattavasti suuremmat kuin BHI:ssa ja 0,1 % sakkaroosipitoisuudessa muodostuneiden biofilmien. Syljessä muodostuneen biofilmin määrässä ei ole yhtä suurta vaihtelua pitoisuuksien välillä. Biofilmiä muodostui nopeammin sakkaroosin läsnä ollessa. Zhao ym. (2014) mukaan yli 5 %:n sakkaroosikonsentraatiolla on enemmän kariogeenistä potentiaalia *S. mutans*'n kiinnittymiselle ja kariogeenisen biofilmin muodostumiselle. Tässä tutkimuksessa tutkittiin pienempiä pitoisuuksia sakkaroosia ja jo niillä oli selkeä ero biofilmin määrään ja tarttumiseen, kun vertaa kasvatusalustaa, jossa ei ollut yhtään sakkaroosia.

Biofilmin määrää ja tarttumista tutkimalla huomattiin, että BHI:ssa kasvatettuna *S. mutans* CI2366 tuotti kannoista eniten biofilmiä. Eri kantojen erot kuitenkin korostuivat syljessä kasvaessa. *S. mutans* CI2366 tuotti biofilmiä sakkaroosista riippumatta. *S.*

*mutans* Ingbritt puolestaan tuotti biofilmiä mittauksen alussa sakkaroosista riippumatta, mutta mittauksen edetessä biofilmin tuotto väheni ilman sakkaroosia. *S. mutans* NCTC 10449 tuotti vähemmän biofilmiä, kun sakkaroosia ei ollut kasvatusalustalla. *S. mutans* NCTC 10449 ja Ingbritt ovat olleet jo vuosikymmeniä laboratoriossa. Ne ovat todennäköisimmin sopeutuneet aikojen kuluessa laboratorio-olosuhteisiin, eli kasvamaan rikkaissa ravintoliuoksissa kuten BHI:ssa. *S. mutans* CI2366 on puolestaan joutunut pärjäämään syljessä vielä ihan lähiaikoina, koska se on koehenkilön suusta eristetty kliininen isolaatti (Söderling ja Hietala-Lenkkeri 2010). *S. mutans* Ingbritt tuotti syljessä kasvatettuna hitainten happoa ja nopeinten tuotti *S. mutans* CI2366. Tätä saattaa selittää kantojen alkuperien erot: CI2366 on tottunut elämään syljessä ja tuottaa siten paremmin happoa kuin Ingbritt. *S. mutans* Ingbritt ja NCTC 10449 ovat sopeutuneet kasvamaan BHI:ssa, mikä selittää sen, että BHI:ssa muodostui enemmän biofilmiä kuin syljessä.

pH:n seurannalla saatiin reaaliaikaista tietoa biofilmin sisäisen pH:n muutoksesta vuorokauden ajalta. Liun ym. (2021) tutkimusten mukaan *S. mutans*'n biofilmin pH arvo oli alempi ECC lapsilla verrattuna lapsiin, joilla ei esiintynyt kariesta. *S. mutans*'n kannat tuottavat siten eri tavalla happoa, mikä selittää eroja kariesalttiudessa.

Kaikissa kannoissa sakkaroosin lisääminen laski pH:ta. *S. mutans* kykenee kuljetta-  
maan ja metabolisoimaan laajan valikoiman hiilihydraatteja orgaanisiksi hapoiksi ja selviytymään happamissa olosuhteissa ja vuorovaikuttamaan muiden kolonisoivien mikro-organismien kanssa (Lemos ym. 2019, Krzyściak ym. 2013). Tämä selittää pH:n laskun sakkaroosin lisäämisen seurauksena. *S. mutans* NCTC 10449:n pH:n lasku BHI:ssa oli kaikkein nopeinta ja *S. mutans* Ingbritt:n hitainta. *S. mutans* Ingbritt tuotti syljessä kasvatettuna hitainten happoa ja nopeinten tuotti *S. mutans* CI2366. Aiemmat tutkimukset osoittavat, että *S. mutans*'n eri kantojen biofilmit kasvavat eri nopeuksilla happamissa olosuhteissa (Liu ym. 2018).

Kantojen huomattiin käyttäytyvän eri tavoin tutkimusmenetelmien perusteella, vaikka kaikki ovat *S. mutans* -kantoja. Tutkituista kannoista *S. mutans* CI2366 oli virulentein etenkin syljessä kasvatettuna: se tuotti nopeinten happoa ja eniten biofilmiä. Biofilmien muodostuessa BHI:ssa hajontaa oli hieman virulenssisuuden suhteen eri menetelmien välillä, ja *S. mutans* NCTC 10449 tuotti nopeinten happoa. Mikroitiitteri tutkimuksen mukaan eniten biofilmiä tuotti *S. mutans* Ingbritt ja biofilmin määrää ja tarttumista

mittaamalla huomattiin *S. mutans* CI2366:n tuottavan eniten biofilmiä BHI:ssa. Biofilmin muodostuminen on monimutkainen prosessi ja siihen vaikuttaa monta eri asiaa. Tästä syystä sen tutkimiseen tarvitaan useampia eri menetelmiä, jotta ymmärretään paremmin sen muodostumiseen vaikuttavia tekijöitä.

## LÄHTEET

Allkja, J., van Charante, F., Aizawa, J., Reigada, I., Guarch-Pérez, C., Vazquez-Rodríguez, J.A., Cos, P., Coenye, T., Fallarero, A., Zaat, S., Felici, A., Ferrari, L., Azevedo, N., Parker, A., M. Goeres, D. 2021: Interlaboratory study for the evaluation of three microtiter plate-based biofilm quantification methods. *Scientific Reports* 11 (1): 13779-13779.

Avilés-Reyes, A., Miller, J., Lemos, J., Abranches, J. 2017: The Collagen Binding Proteins of *Streptococcus mutans* and Related Streptococci. *Mol Oral Microbiol* 32 (2): 89-106.

Bowen, W.H., Burne, R.A., Wu, H., Koo, H. 2018: Oral biofilms: pathogens, matrix and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol* 26 (3): 229-242.

Bowen, W.H., Koo, H. 2011: Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Research* 45 (1): 69-86.

Bowen, W.H. 2016: Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. *Molecular oral microbiology* 31 (3): 228-233.

Devulapalle, K.S., Mooser, G. 2001: Glucosyltransferase Inactivation Reduces Dental Caries. *Journal of Dental Research* 80 (2): 466–469.

Eriksson, L., Holgerson, P.L., Esberg, A., Johansson, I. 2018: Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* 97 (3): 275–282.

Esberg, A., Sheng, N., Mårell, L., Claesson, R., Persson K., Borén, T., Strömberg, N. 2017: *Streptococcus Mutans* Adhesin Biotypes that Match and Predict Individual Caries Development. *EBioMedicine* 24 (C): 205-215.

Forssten, S., Björklund, M., Ouwehand, A. 2010: *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients* 2 (3): 290-298.

Gutiérrez, D., Hidalgo-Cantabrana, C., Rodríguez, A., García, P., Ruas-Madiedo, P. 2016: Monitoring in Real Time the Formation and Removal of Biofilms from Clinical Related Pathogens Using an Impedance-Based Technology. *PLOS ONE* 11 (10): 1–17.

Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., Skalniak, A. 2013: The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 33 (4): 499-515.

Lemos, JA., Palmer, SR., Zeng, L., Wen, ZT., Kajfasz, JK., Freires, IA., Abranches, J., Brady, LJ. 2019: The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr* 7 (1).

Lenander-Lumikari, M., Loimaranta, V. 2000: Saliva and Dental Caries. *Advances in Dental Research* 14 (1): 40-47.

Liu, S., Li, H., Zhang, K., Guo, Z., Zheng, Q., Hu, F., Zhang, W., Sun, Y., Guan, J. 2021: Phenotypic and genetic characteristics of *Streptococcus mutans* isolates from site-specific dental plaque in China. *Journal of Medical Microbiology* 70 (3): 1-11.

Liu, Y., Palmer, SR., Chang, H., Combs, AN., Burne, RA., Koo, H. 2018: Differential oxidative stress tolerance of *Streptococcus mutans* isolates affects competition in an ecological mixed-species biofilm model. *Environmental Microbiology Reports* 10 (1): 12–22.

Marsh, P.D. 2018: In sickness and in health – what does the oral microbiome mean to us? An ecological perspective. *Advances in Dental Research* 29 (1): 60-65.

Momeni, S., Ghazal, T., Grenett, H., Whiddon, J., Moser, S., Childers, N. 2019: *Streptococcus mutans* serotypes and collagen-binding proteins Cnm/Cbm in children with caries analyzed by PCR. *Molecular Oral Microbiology* 34 (2): 64-73.

Optical pH Sensors for Contactless or Minimally Invasive Measurements. PreSens. Saataavilla internetissä: <https://www.presens.de/products/ph/sensors#c1095> (viitattu 25.10.2021).

Simón-Soro, A., Mira, A. 2015: Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology* 23 (2): 76–82.

Stefanowicz-Hajduk, J., Adamska, A., Bartoszewski, R., Renata, O. 2016: Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. *BioTechniques* 61 (3): 117-122.

Söderling, EM., Hietala-Lenkkeri, A-M. 2010: Xylitol and Erythritol Decrease Adherence of Polysaccharide-Producing Oral Streptococci. *Current Microbiology* 60 (1): 25-29.

Zhao, W., Li, W., Lin, J., Chen, Z., Yu, D. 2014: Effect of Sucrose Concentration on Sucrose-Dependent Adhesion and Glucosyltransferase Expression of *S. mutans* in Children with Severe Early-Childhood Caries (S-ECC). *Nutrients* 6 (9): 3572-3586.

Zhou, Y., Millhouse, E., Shaw, T., Lappin, D., Rajendran, R., Bagg, J., Lin, H., Ramage, G. 2018: Evaluating *Streptococcus mutans* Strain Dependent Characteristics in a Polymicrobial Biofilm Community. *Frontiers in Microbiology* vol 9: 1498-1498.