Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/216929

File ID	216929
Filename	Dutch summary

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Microbial community interactions: effects of probiotics on oral microcosms
Author	L.C. Phạm
Faculty	Faculty of Dentistry
Year	2011
Pages	163
ISBN	978-90-5776-224-6

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/378077

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

SAMENVATTING

Dit proefschrift is een onderdeel van het onderzoeksproject "Probing Dynamic Microbial Community Interactions" binnen de Nederlandse Technologiestichting STW. Het uiteindelijke doel van dit onderzoek was het verwerven van een algemeen inzicht in het dynamische samenspel tussen omgevings- en gastheerfactoren en microbiële ecosystemen, en om te begrijpen hoe dit kan leiden tot een gezonde mond, of juist het ontstaan van ziekte.

Voor onderzoek naar microbiële ecosystemen is het van cruciaal belang om te beschikken over een '*high throughput*' methode om micro-organismen te identificeren en kwantificeren. Bij het gebruik van enkel fenotypische testen worden isolatie en identificatie van micro-organismen gelimiteerd tot slechts een aantal species, waaronder de meest bekende pathogenen.

Het doel van het project in dit proefschrift was daarom om een makkelijke, kostenefficiënte en nauwkeurige techniek te ontwikkelen om *high throughput* screening van de samenstelling en dynamiek van het microbiële ecosysteem van de mond mogelijk te maken.

De focus lag daarbij met name op de gevolgen van een verstoring door twee specifieke stammen van *Lactobacillus,* namelijk *L. salivarius* W24 (hoofdstuk II) en *L. rhamnosus* GG (hoofdstuk IV en V), voor het orale microbiële ecosysteem, met betrekking tot de samenstelling, de productie van zuren, en het cariogene potentieel.

Als model voor een complex oraal microbieel ecosysteem (hoofdstuk II, III, en IV) werden '*microcosms*' uit speeksel gebruikt. Voor de *high throughput* screening van de samenstelling van deze complexe orale biofilms is een gerichte methode ontwikkeld: multiplex-dependent ligation probe amplification (MLPA). In de hoofdstukken III, IV en V worden de toepasbaarheid en toetsing van deze methode voor karakterisering van deze *microcosms* behandeld.

In **hoofdstuk II** is met behulp van de DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) fingerprinting-methode onderzocht hoe een *microcosm* uit speeksel kon worden verstoord door de probiotische darmbacterie *L. salivarius* W24. Dit

probioticum wordt aan sommige commerciële producten toegevoegd om de gezondheid van het maag- en darmstelsel te verbeteren. Het bleek dat *L. salivarius* W24 zelf geen biofilms kon vormen, en ook niet kon integreren in reeds bestaande biofilms. Wel kon W24 zich vestigen in een *microcosm* uit speeksel wanneer W24 en het speeksel tegelijk werden geïnoculeerd. Na deze integratie in het microbiële ecosysteem, kon *L. salivarius* W24 de ecologie van complexe biofilms die groeiden in de aanwezigheid van sucrose beïnvloeden: de pH werd verlaagd, en de microbiële diversiteit was verminderd. Deze resultaten suggereren dat dit specifieke probioticum het cariogene potentieel van het orale microbiële ecosysteem kan verhogen wanneer het zich zou kunnen vestigen in de mond. Verder is met deze studie ook aangetoond dat een relatief eenvoudige test, waarbij een probioticum en een complexe orale biofilm met elkaar in contact komen, gebruikt kan worden om te onderzoeken of een probioticum eventueel schadelijke effecten kan hebben op het microbiële ecosysteem van de mond.

In **hoofdstuk III** is de ontwikkeling en toepasbaarheid beschreven van de MLPA techniek voor de relatieve kwantificering van bacteriële species in complexe biofilms. MLPA is een nieuwe methode om verschillende genetische afwijkingen te detecteren, ontwikkeld in Amsterdam door wetenschappers van MRC-Holland in samenwerking met de Vrije Universiteit.

Om een aantal representatieve en bekende orale micro-organismen te identificeren op zowel geslacht en species niveau werd een set van specifieke MLPA-probes ontworpen. Met behulp van deze probes konden de verwachte verschillen in samenstelling van het orale microbiële ecosysteem zichtbaar worden gemaakt. Na het ontwerpen van de benodigde specifieke probes, was MLPA een snelle, eenvoudige, voordelige, en zeer gevoelige methode waarbij onderscheid kon worden gemaakt tussen sequenties die in slechts één nucleotide verschillen.

In **hoofdstuk IV** is de interactie tussen de probiotische darmbacterie *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) en de cariogene mondbacterie *Streptococcus mutans* bestudeerd in een biofilm bestaande uit deze twee species. Ook is onderzocht of LGG invloed

had op het cariogene potentieel en de microbiële samenstelling van *microcosms* uit speeksel.

LGG had een remmend effect op de groei van streptokokken, zowel in een biofilm van twee species, als in *microcosm*s. LGG had echter geen significant effect op het cariogene potentieel van de *microcosms*. Hieruit kunnen wij concluderen dat LGG een niet-cariogeen probioticum is.

Verder werd aangetoond dat de MLPA methode geschikt is voor het aantonen van veranderingen in de samenstelling van *microcosms*, die zijn veroorzaakt door verschillende groeimedia, door verschillen tussen individuele speekselmonsters, en door verstoringen met het probioticum LGG.

In **hoofdstuk V** zijn de resultaten van de MLPA methode vergeleken met de uitkomsten van de *high throughput* 454 pyrosequencing methode, toegepast op dezelfde monsters. De resultaten van MLPA en 454 pyrosequencing waren vergelijkbaar wat betreft het onderscheiden van de effecten van inoculum en kweekcondities op de samenstelling van een microbieel ecosysteem. Dit bevestigt dat MLPA een valide methode is om complexe biofilms te karakteriseren. Bovendien kunnen met behulp van de resultaten van de 454 pyrosequencing methode een aantal relevante probes worden geselecteerd voor verdere analyses.

Al tientallen jaren ligt binnen onderzoek naar infectieziektes en ziektes van de mond de focus voornamelijk op slechts een enkel pathogeen. Recente ontwikkelingen suggereren echter sterk dat de micro-organismen in tandplaque als een gemeenschap functioneren, en niet als afzonderlijke individuen.

Methoden om microbiële ecosystemen te karakteriseren, zoals de MLPA methode met specifieke probes die werd ontwikkeld gedurende dit project, en de pyrosequencing methode die werd gebruikt ter validatie van MLPA, zullen daarom onmisbaar worden voor onderzoek naar de gezondheid van de mond. Dergelijke tools om microbiële ecosystemen te karakteriseren kunnen op vele manieren worden toegepast. Zo kunnen ze worden gebruikt om de effecten van behandelingen op de microbiële samenstelling te volgen, de aaneenschakeling van microbiota gedurende

de ontwikkeling van cariës en parodontitis te bestuderen, of het risico op mondziekten te beoordelen.

In de nabije toekomst zal niet meer alleen de aanwezigheid van micro-organismen, maar ook hun activiteit worden onderzocht, bijvoorbeeld door gebruik te maken van probes gebaseerd op mRNA sequenties, of door sequencing van het complete RNA van een microbioom of zelfs een volledig metagenoom. Tegelijk met deze nieuwe ontwikkelingen zullen ook nieuwe uitdagingen ontstaan op het gebied van gegevensverwerking en de interpretatie van de resultaten. Maar, uiteindelijk zullen dergelijke ontwikkelingen de kloof dichten tussen de nu beschikbare kennis en ons uiteindelijke doel: inzicht verkrijgen in dynamische interacties binnen microbiële ecosystemen, inzichten die de basis zullen vormen voor een fundamenteel begrip, en aanpak, van de problemen die complexe microbiële ecosystemen kunnen veroorzaken.