

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytetu Łódzkiego

Dominika Szczerbiec

**Wpływ drobnoustrojów z rodzaju
Lactobacillus izolowanych z moczu na
patogenność *Proteus mirabilis* i rozwój
infekcyjnej kamicy moczowej**

The influence of microorganisms of the genus
Lactobacillus isolated from urine on the pathogenicity
of *Proteus mirabilis* and the development of infectious
urolithiasis

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biologii Bakterii,
Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii
i Immunologii

pod kierunkiem
dr hab. Agnieszki Torzewskiej, prof. UŁ

SPIS TREŚCI

I.	WSTĘP	
I.1.	Zakażenia układu moczowego	9
I.2.	Czynniki chorobotwórczości <i>P. mirabilis</i>	11
I.3.	Infekcyjna kamica moczowa.....	13
I.3.1.	Tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych.....	14
I.3.2.	Leczenie infekcyjnej kamicy moczowej	16
I.4.	Naturalna mikrobiota dróg moczowych.....	19
I.5.	Charakterystyka <i>Lactobacillus</i> spp.....	22
I.6.	Właściwości antagonistyczne <i>Lactobacillus</i> wobec patogenów.....	26
I.7.	Dysbioza mikrobiomu układu moczowego.....	30
I.8.	Drobnoustroje <i>Lactobacillus</i> w leczeniu ZUM oraz chorób związanych z układem moczowym.....	32
II.	CEL PRACY.....	35
II.1.	Realizacja zadań badawczych.....	35
III.	PUBLIKACJE STANOWIĄCE PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	39
III.1.	Publikacja 1.....	40
III.2.	Publikacja 3.....	58
III.3.	Publikacja 3.....	75
IV.	WYNIKI NIEOPUBLIKOWANE.....	92
IV.1.	Materiały i metody.....	92
IV.1.1.	Otrzymywanie supernatantów pochodzących z <i>Lactobacillus</i>	92
IV.1.2.	Izolacja zewnątrzkomórkowych białek oraz polisacharydów <i>Lactobacillus</i>	92

IV.1.3. Otrzymywanie kryształów struwitu.....	93
IV.1.4. Pomiar potencjału zeta kryształów struwitu.....	93
IV.1.5. Ocena pola powierzchni agregatów struwitu.....	94
IV.1.6. Analiza statystyczna.....	94
IV.2. Wyniki.....	95
IV.2.1. Wpływ zewnątrzkomórkowych białek oraz polisacharydów <i>Lactobacillus</i> na potencjał zeta kryształów struwitu.....	95
IV.2.2. Wielkość agregatów struwitu w obecności zewnątrzkomórkowych białek oraz polisacharydów <i>Lactobacillus</i>	96
IV.3. Podsumowanie wyników stanowiących nieopublikowaną część pracy....	97
V. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI.....	99
VI. DYSKUSJA.....	102
VII. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	113
VIII. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	115
IX. LITERATURA.....	117
X. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW.....	129

**Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej
łączącej trzy artykuły opublikowane z nieopublikowanymi
wynikami oryginalnymi**

1. **Szczerbiec D.**, Piechocka J., Głowacki R., Torzewska A. *Organic acids secreted by Lactobacillus ssp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic Proteus mirabilis.* Molecules. 2022, 27, 5557. doi:10.3390/molecules27175557

IF: 4,6 (2022), Punktacja MEiN: 140 pkt

2. **Szczerbiec D.**, Bednarska-Szczepaniak K., Torzewska A. *Antibacterial properties and urease suppression ability of Lactobacillus inhibit the development of infectious urinary stones caused by Proteus mirabilis.* Sci. Rep. 2024, 14, 934. doi: 10.1038/s41598-024-51323-0

IF: 4,6 (2022), Punktacja MEiN: 140 pkt

3. **Szczerbiec D.**, Słaba M., Torzewska A. *Substances Secreted by Lactobacillus spp. From the Urinary Tract Microbiota Play a Protective Role against Proteus mirabilis Infections and Their Complications.* Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 103. doi: 10.3390/ijms25010103

IF: 5,6 (2022), Punktacja MEiN: 140 pkt

Łączny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: 14,8

Łączna punktacja MEiN prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: 420

Wykaz pozostałych publikacji

1. Stolarek P., Bernat P., **Szczerbiec D.**, Różalski A. *Phospholipids and fatty acids affect the colonization of urological catheters by Proteus mirabilis*. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(16), 8452. doi:10.3390/ijms22168452

IF: 6,208 (2021), Punktacja MEiN: 140 pkt

2. Torzewska A., Wiewiura P., Brodecka D., **Szczerbiec D.** Różalski A. *Potentially probiotic Lactobacillus strains derived from food intensify crystallization caused by Proteus mirabilis in urine*. Probiotics Antimicrob. Proteins. 2021, 13, 441-452, doi:10.1007/s12602-020-09689-w

IF: 5,265 (2021), Punktacja MEiN: 70 pkt

Łączny IF wszystkich opublikowanych prac: 26,273

Łączna punktacja MEiN wszystkich opublikowanych prac: 630

Komunikaty zjazdowe

- 1) **Szczerbiec D.**, Torzewska A. *Organic acids produced by Lactobacillus strains isolated from urine reduce Proteus mirabilis adhesion and biofilm formation.* Congress of European Microbiologists FEMS 9-13.07.2023, Hamburg, Niemcy, plakat M318
- 2) **Szczerbiec D.**, Bednarska-Szczepaniak K., Torzewska A. *Wpływ kwasu mlekowego wytwarzanego przez szczepy Lactobacillus na aktywność ureazy.* VI Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego 16.06.2023, Łódź, Polska, plakat MM-1
- 3) **Szczerbiec D.**, Torzewska A. *Wpływ mikrobioty dróg moczowych na proces powstawania infekcyjnych kamieni moczowych w badaniach in vitro.* XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów 15-17.09.2022, Warszawa, Polska, plakat 0095
- 4) Torzewska A., **Szczerbiec D.** *Kwasy organiczne jako czynniki ograniczające patogenność i żywotność bakterii uropatogennych.* XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów 15-17.09.2022, Warszawa, Polska, plakat 0122
- 5) **Szczerbiec D.**, Mizgalska A., Piechocka J., Głowacki R., Torzewska A. *Influence of extracellular substances secreted by Lactobacillus ssp. on infectious urolithiasis caused by Proteus mirabilis.* IUMS 2022 Congress 20-22.07.2022, Rotterdam, Holandia, plakat
- 6) **Szczerbiec D.**, Torzewska A. *Wpływ Lactobacillus gasseri izolowanego z moczu na powstawanie infekcyjnych kamieni moczowych in vitro.* V Sesja Młodych Mikrobiologów 10.06.2022, Łódź, Polska, prezentacja ustna MM-5
- 7) **Szczerbiec D.**, Torzewska A. *Lactobacillus strains isolated from human urine inhibit crystallization caused by Proteus mirabilis in the development of infectious urolithiasis.* 13th International Symposium on Lactic Acid Bacteria 23-25.08.2021, Amsterdam, Holandia, plakat
- 8) **Szczerbiec D.**, Torzewska A. *Działanie antybakteryjne szczepów Lactobacillus na uropatogenne szczepy Proteus mirabilis.* VI Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, Łódź, Polska, plakat P. 9

Źródło finansowania



UNIwersytet
ŁÓDZKI

Doktoranckie Granty Badawcze „Inicjatywa
Doskonałości-Uczelnia Badawcza (IDUB).

Kierownik projektu badawczego pt: *Zewnątrzkomórkowe substancje wydzielane przez Lactobacillus jako czynnik modulujący krystalizację w infekcyjnej kamicy moczowej powodowanej przez Proteus mirabilis.* (7/DGB/IDUB/2022).

Wykaz skrótów

AHA –ang. *aceto hydroxamic acid*, kwas aceto hydroksamowy

Apf – ang. *aggregation-promoting factor*, czynnik sprzyjający agregacji

ATF – ang. *ambient temperature fimbriae*

CAUTIs – ang. *catheter-associated urinary tract infections*, zakażenie układu moczowego związane z cewnikowaniem

Cpf – ang. *coaggregation-promoting factor*, czynnik sprzyjający koagregacji

EDTA- ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, wodny roztwór kwasu etylenodiaminotetraoctowego

EFSA – ang. *European Food Safety Authority*, Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności

EPS – ang. *exopolysaccharides*, egzopolisacharydy

EQUOC – ang. *enhanced quantitative urine culture*, ulepszona ilościowa hodowla moczu

GABA – ang. *gamma-aminobutyric acid*, kwas gamma-aminomasłowy

GRAS – ang. *generally recognised as safe*, uważane za bezpieczne

IFN- γ – ang. *interferon γ* , interferon γ

IL – ang. *interleukin*, interleukina

LAB – ang. *lactic acid bacteria*, bakterie kwasu mlekowego

LC-MS/MS – ang. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas

LDH – ang. *lactate dehydrogenase*, dehydrogenaza mleczanowa

LPS – ang. *lipopolysaccharide*, lipopolisacharyd

MALDI-TOF MS– ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*, spektrometr mas z desorpcją/ionizacją laserową, wspomagana matrycą i pomiarem czasu przelotu jonów

MR/K – ang. *mannose resistant Klebsiella like fimbriae*

MR/P – ang. *mannose resistant Proteus like fimbriae*

MRSA – ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, gronkowiec złocisty oporny na metycylinę

MTT – ang. (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylotetrazoliowy

NAF – ang. *nonagglutinating fimbriae*

NGS – ang. *next-generation sequencing*, sekwencjonowanie nowej generacji

NF- κ B – ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, czynnik jądrowy kappa-wzmacniacz łańcucha lekkiego aktywowanych komórek B

PBS – ang. *phosphate buffered saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PCNL – ang. *percutaneous nephrolithotomy*, przezskórna nefrolitotrypsja

PMF – ang. *Proteus mirabilis fimbriae*

PMP – ang. *Proteus mirabilis P-like fimbriae*

Pta – ang. *Proteus toxic agglutinin*, toksyczna aglutynina *Proteus*

QPS – ang. *Qualifies presumption of safety*, Status kwalifikowanego domniemania bezpieczeństwa

SWL – ang. *shock-wave lithotripsy*, litotrypsja falą uderzeniową

SXT – ang. *trimethoprim/sulfamethoxazole*, trimetoprim/sulfametoksazol

TLR4 – ang. *toll-like receptor 4*, receptor toll-podobny 4

TNF- α – ang. *tumor necrosis factor α* , czynnik martwicy nowotworów

TSB – ang. *tryptic soy agar*, agar tryptonowo-sojowy

UM – układ moczowy

ZUM – zakażenia układu moczowego

I. Wstęp

I.1. Zakażenia układu moczowego

Zakażenia układu moczowego (ZUM) to obecnie jedne z najczęstszych infekcji bakteryjnych występujących u ludzi, które corocznie dotyczą nawet 150 milionów społeczeństwa na całym świecie [1]. Na rozwój tych zakażeń ma wpływ wiele czynników o charakterze anatomicznym, genetycznym oraz fizjologicznym m.in. płeć (częściej zakażenia układu moczowego rozwijają się u kobiet), wiek, kontakty seksualne, wady wrodzone, nietrzymanie moczu, neurogenna dysfunkcja pęcherza moczowego, cewnikowanie, wady wrodzone dróg moczowych oraz choroby towarzyszące jak cukrzyca [2,3]. Zakażenia dróg moczowych mogą obejmować zakażenia dolnego odcinka układu moczowego, gdy mamy do czynienia z zapaleniem pęcherza moczowego lub zapaleniem cewki moczowej oraz zakażenia górnego odcinka dróg moczowych, gdy zakażenie objęło nerki [1]. ZUM można również sklasyfikować na infekcje powikłane oraz niepowikłane. Niepowikłane ZUM to infekcje obserwowane u pacjentów bez czynników ryzyka, które zwiększałyby podatność pacjentów na rozwój zakażeń. Najczęstszym patogenem w tym przypadku jest bakteria *Escherichia coli*, która jest odpowiedzialna za nawet 80% tych zakażeń. Z kolei powikłane zakażenia układu moczowego rozwijają się w przypadku nieprawidłowości strukturalnych oraz funkcjonalnych układu moczowego, głównie u osób z wadami anatomicznymi, po zabiegach chirurgicznych lub cewnikowaniu. Jednym z głównych patogenów odpowiadających za powikłaną postać ZUM jest *Proteus mirabilis* [4], ale są to również takie drobnoustroje jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. oraz *Enterococcus* spp. [5]. *P. mirabilis* to Gram-ujemna pałeczka, należąca do rodziny Morganellaceae [6], występująca naturalnie w wodzie, glebie oraz stanowiąca mikrobiotę komensalną układu pokarmowego człowieka i zwierząt. Jednocześnie jako patogen oportunistyczny, odpowiada za różnorodne zakażenia m.in. zakażenia ran, zakażenia szpitalne, zakażenia dróg oddechowych oraz jak wspomniano, zakażenia układu moczowego [7]. Drobnoustroje *P. mirabilis* odpowiadają za około 44% zakażeń związanych z cewnikowaniem (CAUTIs), a nieleczone infekcje mogą prowadzić do niebezpiecznych powikłań, takich jak: zatrzymywanie moczu w niedrożnych cewnikach, posocznica czy zapalenie pęcherza i odmiedniczkowe zapalenie nerek [8].

Zakażenie układu moczowego bakteriami *P. mirabilis* najczęściej zapoczątkowuje kolonizacja cewki moczowej. Ze względu na fakt, że *P. mirabilis* jest mikroorganizmem występującym w przewodzie pokarmowym, przypuszcza się, że infekcje układu moczowego rozpoczynają się najczęściej od zakażenia okolicy okołocewkowej. Mnogość czynników chorobotwórczości umożliwia skuteczną kolonizację dalszych odcinków dróg moczowych, pęcherza moczowego a nawet i nerek. Wskazuje się, że w 0,34% przypadków ZUM, uropatogeny mogą prowadzić do zakażenia w obrębie nerek, a następnie rozprzestrzeniać się do krwioobiegu co skutkować może ogólnoustrojową reakcją zapalną i posocznicą. Te wartości wzrastają jednak u pacjentów hospitalizowanych, gdzie aż 42% pacjentów z sepsą stanowią pacjenci, u których infekcja rozpoczęła się poprzez układ moczowy [9].

Zalecanym leczeniem zakażeń układu moczowego pałeczkami *P. mirabilis* jest 3 dniowa kuracja antybiotykiem SXT (trimetoprim-sulfametoksazol), fluorochinolonami, nitrofurantoiną lub fosfomycyną [10]. Jednakże, rosnącą antybiotykooporność drobnoustrojów *P. mirabilis* udokumentowano na wiele chemioterapeutyków jak cefalosporyny i penicyliny należące do β -laktamów, fluorochinolony, nitrofurantoinę, fosfomycynę, aminoglikozydy, tetracykliny oraz SXT [11–13]. Zakażenia układu moczowego mają bardzo często charakter nawracający, a leczenie antybiotykami wiąże się z wieloma skutkami, w tym jak już wspomniano, rosnącą antybiotykoopornością bakterii. Nadzieję stanowią alternatywne środki wspomagające leczenie ZUM. Przykładem jest fitoterapia, czyli wykorzystywanie wyrobów leczniczych powstałych z naturalnych produktów roślinnych. Najlepiej zbadanym naturalnym środkiem o potencjale w leczeniu i zapobieganiu rozwojowi infekcji jest żurawina. Jej dobrze poznany skład chemiczny obejmuje kwasy fenolowe, antocyjany, flawony, flawonoidy i kwasy organiczne [14]. Jej skuteczność w tym zakresie nadal jest szeroko badana w badaniach *in vitro* [15] oraz badaniach klinicznych [16,17]. Żurawina ma działanie antybakteryjne oraz wykazuje działanie hamujące adhezję patogenów do nabłonka dróg moczowych [14]. Kolejnym alternatywnym środkiem może być stosowanie preparatów probiotycznych zawierających gatunki *Lactobacillus*. Lactin-V to preparat zawierający szczep *L. crispatus* CTV-05, produkujący H_2O_2 , wyizolowany z pochwy, wykorzystywany w leczeniu oraz wspomaganiu leczenia bakteryjnego zapalenia pochwy. Badania Stapleton i in. [18] wykazały, że powyższy preparat z sukcesem może być wykorzystywany również

w nawracających zakażeniach układu moczowego. W powyższych badaniach, infekcje układu moczowego występowały w mniejszym stopniu w grupie badanej, której podawano probiotyk ze szczepem *L. crispatus* dopochwowo (15%) w porównaniu do grupy kontrolnej, gdzie obserwowano nawracające ZUM na poziomie 27%. Szczepy probiotyczne wykorzystywane w preparatach wspomagających leczenie infekcji układu moczowo-płciowego działają na patogeny poprzez wiele mechanizmów antagonistycznych, m.in. wykazują działanie przeciwbakteryjne, hamują tworzenie biofilmów przez patogeny oraz hamują adhezję patogenów do nabłonka. Kolejną możliwością leczenia nawracających infekcji dróg moczowych jest stosowanie preparatów dostępnych na rynku jak szczepionka Uromune, składająca się z inaktywowanych bakterii najczęściej powodujących ZUM oraz kapsułek immunostymulujących Uro-Vaxom. Badania kliniczne tych preparatów są obiecujące i stanowią alternatywę konwencjonalnego leczenia infekcji układu moczowego [19].

1.2. Czynniki chorobotwórczości *P. mirabilis*

Skuteczną kolonizację wielu środowisk w organizmie gospodarza pałeczkom *P. mirabilis* zapewniają różnorodne czynniki wirulencji oraz mechanizmy, które wpływają na ich chorobotwórczość. Najważniejsze z nich zostały przedstawione na Rycinie 1.

Pałeczki *P. mirabilis* posiadają fimbrie oraz produkują adhezyny, które warunkują skuteczną adhezję do komórek nabłonkowych oraz do powierzchni abiotycznych np. cewników urologicznych. Najszerzej poznane i scharakteryzowane fimbrie i adhezyny *P. mirabilis* to fimbrie MR/P (mannose resistant *Proteus* like fimbriae), MR/K (mannose resistant *Klebsiella* like fimbriae), PMF (*P. mirabilis* fimbriae), ATF (ambient temperature fimbriae), NAF (nonagglutinating fimbriae) oraz PMP (*P. mirabilis* P-like fimbriae) [7,20].

P. mirabilis wytwarzają hemolizynę (HpmA), toksyczną agglutyninę (Pta-*Proteus* toxic agglutinin) oraz metaloproteazę (ZapA). HpmA tworzy pory w błonie komórkowej, co skutkuje wypływem jonów sodu, uszkodzając komórki nabłonka dróg moczowych oraz komórki układu odpornościowego gospodarza. Z kolei toksyna Pta, uszkodza błonę komórkową komórek gospodarza, co prowadzi do wycieku cytoplazmy, zaburzenia ciśnienia osmotycznego oraz depolimeryzacji włókien aktynowych. ZapA produkowana przez *P. mirabilis* może natomiast rozkładać przeciwciała IgG i IgA,

składniki dopełniacza, białka cytoszkieletowe oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe, co znacznie obniża skuteczne działanie wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej gospodarza podczas infekcji [8,20].

Na ich chorobotwórczość wpływa również zdolność tworzenia biofilmu na powierzchniach abiotycznych, głównie cewnikach urologicznych oraz powierzchniach biotycznych, w układzie moczowym. Struktura biofilmu zapewnia drobnoustrojom większą oporność na chemioterapeutyki, składniki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz komórki odpornościowe gospodarza [8].

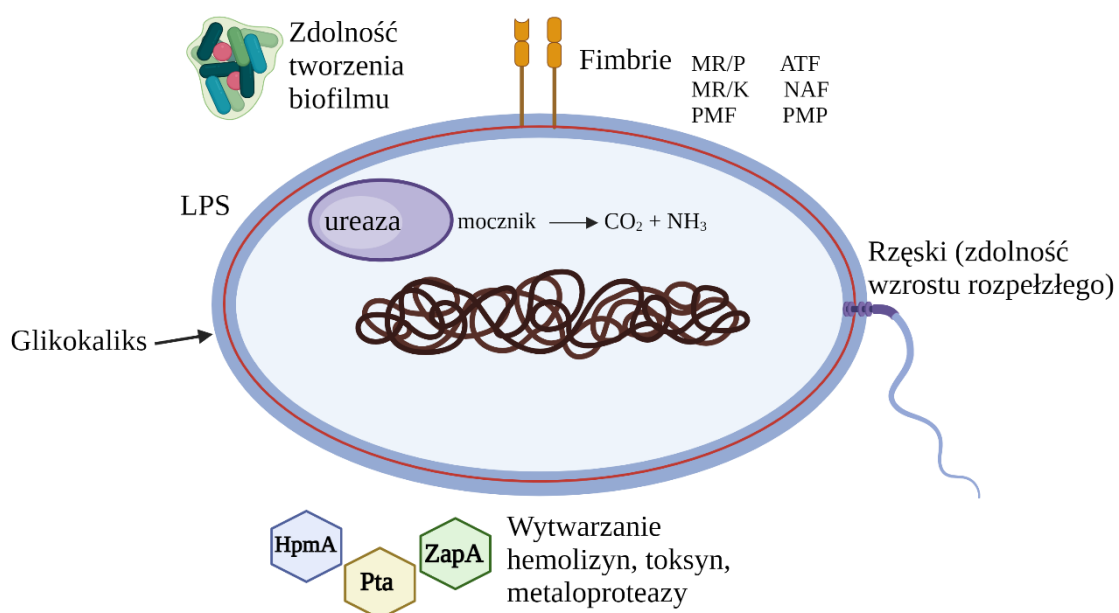
Patogenność *P. mirabilis* warunkuje również zdolność do wzrostu rozpełzłego za pomocą bakteryjnych rzęsek. Zjawisko to polega na przekształcaniu krótkich pałeczek z kilkoma rzęskami do bardzo długich form (20-80 μm) ze zwielokrotnioną liczbą rzęsek rozmieszczonych peritrichalnie. Krótsze formy, z większą ilością fimbrii są bardziej skuteczne w adhezji, natomiast u dłuższych form stwierdzono silniejsze właściwości inwazyjne komórek nabłonka dróg moczowych, wytwarzanie hemolizyny HpmA, ureazy i metaloproteazy ZapA [10,20].

W ścianie komórkowej drobnoustrojów Gram-ujemnych, w tym pałeczek *P. mirabilis*, występuje lipopolisacharyd (LPS) składający się z części O- swoistej (antygen O), rdzenia oraz lipidu A. Część O-swoista zbudowana jest z powtarzających się jednostek polisacharydowych i charakteryzuje się dużą zmiennością struktury chemicznej, co wykorzystywane jest do klasyfikacji serologicznej drobnoustrojów z rodzaju *Proteus*. Zmienność części O-swoistej jest uzależniona od rodzaju obecnych cukrów, reszt cukrowych oraz połączeń między nimi, natomiast charakterystyczną cechą jest obecność u drobnoustrojów z rodzaju *Proteus* kwasów uronowych. Z kolei lipid A zakotwicza LPS w błonie zewnętrznej bakterii i jest związany kowalencyjnie z częścią rdzeniową. LPS jest endotoksyną, uwalnianą z komórek bakteryjnych w następstwie ich namnażania, lizy oraz śmierci. Wykazuje działanie prozapalne i immunostymulujące. Wywołuje szerokie spektrum efektów toksycznych wobec organizmu gospodarza m.in. podwyższenie temperatury ciała, zmiany w liczbie białych krwinek, niedociśnienie oraz może prowadzić do wstrząsu septycznego. Ponadto, odgrywa istotną rolę w zakażeniu, m.in. chroniąc bakterie przed składnikami układu immunologicznego gospodarza [20–22].

Glikokaliks bakteryjny tworzą nierozpuszczalne, ujemnie naładowane polisacharydy. Nie występuje u wszystkich szczepów *Proteus*. Umożliwia wzrost bakterii w postaci biofilmu, chroni bakterie przed działaniem bakteriofagów oraz

fagocytów oraz może brać udział w tworzeniu infekcyjnych kamieni moczowych [20,23].

Kolejnym czynnikiem chorobotwórczości *P. mirabilis* jest enzym-ureaza, który rozkłada mocznik do dwutlenku węgla i amoniaku. Jest to kluczowy enzym w powstawaniu infekcyjnych kamieni moczowych, gdyż alkalizuje środowisko moczu co w konsekwencji prowadzi do jego przesylenia mineralnymi składnikami moczu i powstawania kryształów apatytu i struwitu [7]. Ureaza *P. mirabilis* to enzym zawierający w centrum aktywnym jony niklu, składający się z trzech podjednostek: PmUreA lub PmUre γ (11 kDa), PmUreB lub PmUre β (12,2 kDa) oraz PmUreC lub PmUre α (66 kDa) zorganizowane w oligomer ($\alpha\beta\gamma$)₃ [24].



Rycina 1. Wybrane czynniki wirulencji *P. mirabilis*. Opracowano na podstawie [7], przy użyciu Biorender.com

I.3. Infekcyjna kamica moczowa

Powstawanie kamieni moczowych może mieć różną etiologię. Kamica moczowa stanowi jedną z najczęstszych chorób układu moczowego, z częstością występowania 1-13% w zależności od regionu geograficznego [25]. Ze względu na skład chemiczny wyróżnia się kamienie szczawianowo-wapniowe (50-70%), kamienie fosforanowo-wapniowe (40%), kamienie moczanowe (10-20%), cystynowe (1-2%) oraz struwitowe (5-15%). Na ich powstawanie ma wpływ wiele czynników jak wiek, płeć, nawyki

żywieniowe, czynniki społeczno-ekonomiczne oraz infekcje dróg moczowych [26,27]. Infekcje układu moczowego drobnoustrojami *P. mirabilis* mogą prowadzić do powstawania kamieni struwitowych nazywanych również infekcyjnymi kamieniami moczowymi. Drobnoustroje z rodzaju *Proteus* stanowią jeden z głównych czynników etiologicznych infekcyjnej kamicy moczowej i jak wskazują dane literaturowe, są izolowane nawet z 70% tych kamieni [28]. Może mieć to związek z faktem, że drobnoustroje z rodzaju *Proteus* charakteryzują się wysoką aktywnością ureazy i 100% szczepów tego rodzaju produkują ten enzym. Obok *Proteus*, ureazo-dodatnimi bakteriami są również bakterie z rodzaju *Klebsiella*, *Pseudomonas* oraz *Staphylococcus*. Tymczasem, najczęstszy patogen wywołujący niepowikłane ZUM, *E. coli*, wytwarza ten enzym rzadko. Nie wszystkie infekcje ureazo-dodatnimi bakteriami prowadzą do powstawania infekcyjnych kamieni moczowych. Są czynniki, które predysponują do ich tworzenia, najczęściej zastój moczu spowodowany niedrożnością dróg układu moczowego oraz obecność ciał obcych np. cewników [29]. Infekcyjna kamica moczowa jest częściej spotykana u osób starszych oraz częściej u kobiet niż u mężczyzn, co związane jest z większą skłonnością kobiet do infekcji układu moczowego ze względu na ich budowę anatomiczną [30].

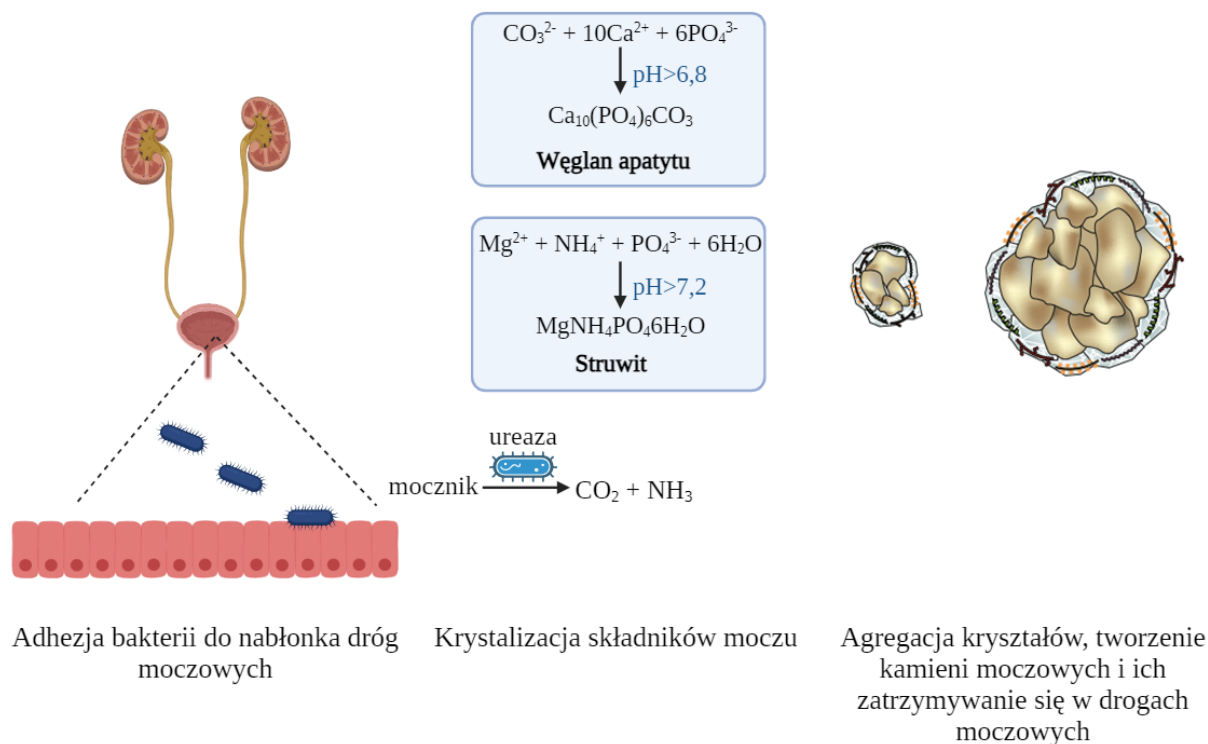
1.3.1. Tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych

Powstawanie infekcyjnych kamieni moczowych można podzielić na kilka głównych etapów, które zostały zobrazowane na Rycinie 2. Pierwszy z nich rozpoczyna się od adhezji bakterii do nabłonka dróg moczowych. Drobnoustroje *P. mirabilis* mogą skutecznie kolonizować tkanki oraz unikać odpowiedzi immunologicznej gospodarza dzięki szeregowi czynników wirulencji. Ureaza, kluczowy enzym produkowany przez *P. mirabilis* biorący udział w tworzeniu infekcyjnych kamieni moczowych, rozkłada mocznik do dwutlenku węgla (CO_2) oraz amoniaku (NH_3). Powstałe jony amonowe podwyższają pH, a co za tym idzie podwyższa się również stężenie jonów amonowych, węglanowych oraz fosforanowych, które wraz z jonami wapnia i magnezu tworzą kryształy węglanu apatytu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$) i kryształy struwitu ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) [31]. Mocz naturalnie ma pH lekko kwaśne (5,8-6,0) i w takim środowisku, powstałe kryształy mogą być rozpuszczane. Jednakże, gdy pH moczu na skutek zachodzących reakcji staje się alkaliczne, kryształy struwitu oraz apatytu z łatwością rosną i zatrzymują w drogach moczowych. Etap krystalizacji składników moczu

spowodowany jest nadmiernym stężeniem soli magnezowych i wapniowych w stosunku do ich rozpuszczalności. Kryształy apatytu tworzą się w pH wynoszącym 6,8, natomiast kryształy struwitu wytrącają się przy nieco wyższym pH, od wartości 7,2 [32].

Amoniak powstały w wyniku hydrolizy mocznika dodatkowo niszczy ochronną warstwę glikozaminoglikanów nabłonka dróg moczowych, co dodatkowo wspomaga skuteczną adhezję kryształów do nabłonka i prowadzi do ich agregacji [29]. Kryształy struwitu tworzą różne morfologicznie formy, kształtem mogą przypominać trumnę „coffin lids” lub mogą przybierać formy dendrytyczne. Ich powstawanie oraz zatrzymywanie się w drogach moczowych prowadzi do uszkodzania nabłonka dróg moczowych, co stanowić może miejsce zarodkowania dla krystalizacji struwitu [33]. W wielu przypadkach powstałe kryształy są wypłukiwane przez moc, a dopiero proces agregacji wielu kryształów struwitu oraz apatytu prowadzi do tworzenia większych form- kamieni moczowych, które stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia [34]. Proces agregacji kryształów zachodzi bardzo szybko, co skutkuje powstawaniem kamieni moczowych w pęcherzu lub nerkach. Składniki komórkowe bakterii *P. mirabilis* jak polisacharydy tworzące glikokaliks, w tym część O-swoista lipopolisacharydu ściany komórkowej, mogą mieć wpływ na proces tworzenia kryształów i ich agregacji. W zależności od składu struktury chemicznej polisacharydów i powinowactwa do wiązania przez nie kationów jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , mogą intensyfikować lub hamować procesy tworzenia kamieni moczowych [35,36].

Na powstawanie kamieni moczowych ma również wpływ odpowiedź obronna organizmu gospodarza. Jak wykazali Reyes i in. [37] reakcja zapalna tocząca się w organizmie oraz znacznie podwyższony poziom cytokin prozapalnych (GRO/KC, IL-1 α , IL-1 β) przyczyniały się do intensyfikacji procesu formowania się kamieni moczowych a tym samym sprzyjaniu uszkodzenia tkanek układu moczowego.



Rycina 2. Etapy tworzenia się infekcyjnych kamieni moczowych. Opracowano na podstawie [38], przy użyciu Biorender.com

I.3.2. Leczenie infekcyjnej kamicy moczowej

Infekcyjna kamica moczowa to rodzaj kamicy wyjątkowo wymagający w leczeniu oraz charakteryzujący się częstymi nawrotami. Ten typ kamicy, cechuje się szybkim przyrostem kryształów, a w rezultacie powstawaniem kamieni moczowych, które w warunkach klinicznych tworzą się w przeciągu nawet 4-6 tygodni [39]. Dodatkowo, skuteczne leczenie utrudnia obecność żywych drobnoustrojów we wnętrzu kamienia, które są bardziej odporne na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych, co prowadzi do częstszych nawrotów choroby. W rezultacie, nieleczona infekcyjna kamica moczowa może prowadzić do ciężkich powikłań, a śmiertelność w takich przypadkach osiąga nawet 30% [29].

Leczenie infekcyjnej kamicy moczowej rozpoczyna się od zdiagnozowania oraz rozpoznania typu kamicy wywołującej objawy. Umożliwia to dokładny wywiad, który przeprowadza się z pacjentem, który koncentruje się na symptomach oraz historii chorób układu moczowego. Następnie obrazowanie USG oraz badanie radiologiczne umożliwia uwidocznienie złogów mogących znajdować się w górnych lub dolnych odcinkach dróg

moczowych. Jednocześnie prowadzi się badanie mikrobiologiczne moczu, które umożliwia izolację patogenu, który wywołał infekcję oraz mierzy się pH moczu. Jeśli pH jest zasadowe, może to świadczyć o rozwoju kamicy moczowej związanej z ureazododatnimi drobnoustrojami [29]. Po etapie rozpoznania patogenu, pierwszym krokiem jest włączenie antybiotykoterapii, w celu eliminacji drobnoustroju, który wywołał zakażenie. Na tym etapie wykorzystuje się antybiotyki stosowane w leczeniu ZUM, głównie SXT, fluorochinolony, nitrofurantoinę lub fosfomycynę.

W następnym etapie usuwa się kamień, obecnie najczęściej stosowanymi metodami jest przezskórna nefrolitotrypsja (PCNL) oraz litotrypsja falą uderzeniową (SWL). Metoda SWL polega na bezinwazyjnym rozkruszeniu kamienia, co w rezultacie umożliwia ich łatwiejsze wydalanie. Zastosowanie tej metody ma jednak pewne ograniczenia i zależy od rozmiaru kamienia oraz jego lokalizacji w organizmie pacjenta. Ta metoda stanowi jednak bardzo często leczenie uzupełniające. PCNL polega natomiast na kruszeniu kamieni z wykorzystaniem przezskórnego nakłucia nerki i jest metodą bardziej inwazyjną [29,30].

Ostatni etap ma na celu zapobieganie nawrotom i w tej fazie stosuje się głównie inhibitory ureazy, środki mające na celu zakwaszenie moczu oraz podaje się antybiotyki, w celu eliminacji bakterii które mogły uwolnić się z rozkruszonego kamienia podczas zabiegów ich usuwania. Leczenie antybiotykami jest długotrwałe i może trwać nawet kilka miesięcy. Najczęściej stosowanymi środkami zakwaszającymi mocz jest kwas askorbinowy oraz L- metionina. Z kolei stosowanym w leczeniu infekcyjnej kamicy moczowej inhibitorem ureazy jest kwas acetohydroksamowy (AHA). Jest to środek, który podawany jest doustnie, mający aktywność hamowania ureazy, enzymu kluczowego w powstawaniu kamieni moczowych. Badania wskazują, że może on osiągać w moczu wysokie stężenia oraz wnika do wnętrza komórek bakteryjnych przez ścianę komórkową. Ma on możliwość zmniejszania przyrostu kamienia, ale nie ma wpływu na już powstałe kamienie, dlatego jest dobrym środkiem uzupełniającym terapię. Udokumentowano jednak, szereg skutków ubocznych w stosowaniu tego preparatu. Wielu pacjentów doświadcza problemów ze strony układu pokarmowego, neurologicznego oraz objawy hematologiczne, występujące nawet u 20% pacjentów [29,30,40]. Wytyczne Amerykańskiego Towarzystwa Urologicznego jasno wskazują, że AHA ze względu na niepożądane efekty, może być stosowany jedynie po wyczerpaniu wszystkich innych możliwości leczenia, głównie u osób z nawracającą postacią tej

choroby [41]. Skutki uboczne obecnych metod leczenia infekcyjnej kamicy moczowej oraz poważne powikłania występujące przy nieleczonej postaci tej choroby, wymagają pilnej alternatywy dla obecnie stosowanej terapii.

Szybka diagnoza, całkowita eradykacja kamienia oraz skuteczna antybiotykoterapia eliminująca patogen wywołujący chorobę, są kluczowe w leczeniu infekcyjnej kamicy moczowej [42]. Większość prac naukowych dotyczy jednak wykorzystania alternatywnych metod w leczeniu innych typów kamicy moczowej, w szczególności, najbardziej rozpowszechnionej kamicy szczawianowo-wapniowej. Mimo tego, są pewne obiecujące doniesienia o wykorzystaniu chemicznych bądź ziołowych składników o potencjale hamującym procesy tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych. Hamowanie ich powstawania może odbywać się na różnych etapach ich tworzenia i poprzez kilka mechanizmów. Pierwszą z możliwości jest niedopuszczenie do przesycenia moczu składnikami mineralnymi poprzez zahamowanie aktywności ureazy. Wzrost i agregacja kryształów mogą być również zahamowane przez powlekanie powierzchni kryształów różnymi substancjami na przykład pirofosforanem sodu [43]. Kolejną możliwością jest tworzenie kompleksów z jonami wapnia i magnezu oraz jonami amonowymi, co hamuje krystalizację składników mineralnych moczu. Jednym z takich składników, jest organiczny związek EDTA, który jak wykazano w pracy Prywer i in. [44] ma działanie hamujące tworzenie kamieni moczowych, gdzie jak zaobserwowano w jego obecności kryształy były mniejsze w porównaniu do kontroli, bez tego związku. Podobne właściwości wykazuje cytrynian trisodowy, który wiąże się z jonami amonowymi oraz magnezowymi tworząc kompleksy w pH od 7 do 9,5 czyli w zakresie pH w którym tworzą się kryształy struwitu [39]. Właściwości hamujące krystalizację w warunkach *in vitro* wykazuje również wiele ekstraktów ziołowych. Mniejszą liczbę oraz wielkość kryształów struwitu obserwowano w przypadku ekstraktów ziołowych pozyskanych z roślin: *Commiphora wightii* [45], *Boerhaavia diffusa*, *Rotula aquatica* [46] i *Phyllanthus emblica* [47], które jak wykazano, wpływały hamująco na zarodkowanie kryształów struwitu.

W ostatnim czasie przybywa badań naukowych dotyczących wpływu probiotyków oraz potencjalnie probiotycznych mikroorganizmów w leczeniu i zapobieganiu kamicy moczowej. Jednakże, większość badań dotyczy roli drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* rozkładających szczawiany w terapii pacjentów z kamicą szczawianowo-wapniową [48]. Ze względu na rosnące

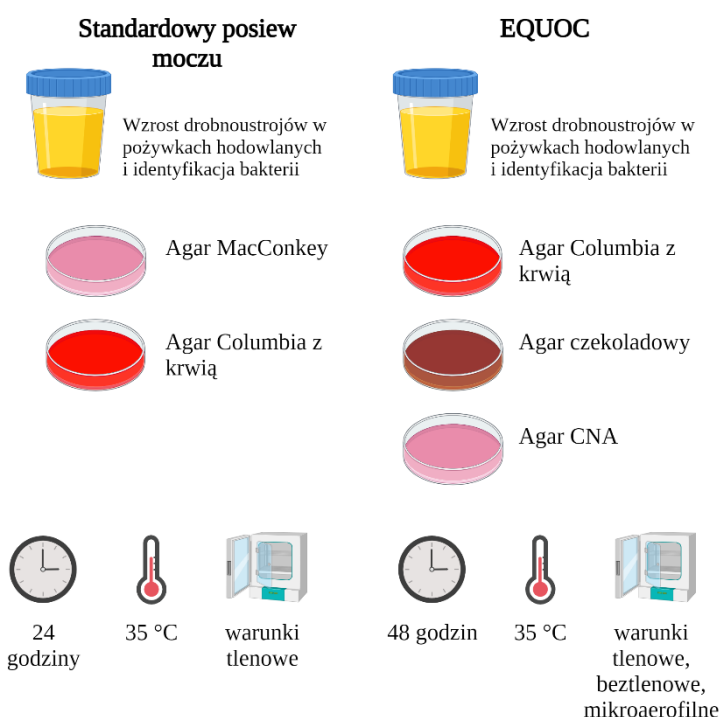
zainteresowanie wykorzystaniem probiotyków w leczeniu zakażeń układu moczowego, interesującym aspektem jest wpływ naturalnej mikrobioty dróg moczowych na uropatogeny, zakażenia układu moczowego oraz tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych. Poszerzenie wiedzy z tego zakresu umożliwi zrozumienie interakcji pomiędzy drobnoustrojami komensalnymi a patogenami w tym środowisku oraz przeanalizowanie mechanizmów zachodzących w układzie moczowym, co w rezultacie może przynieść korzyści w leczeniu, bądź też zapobieganiu chorob układu moczowego.

I.4. Naturalna mikrobiota dróg moczowych

Jeszcze do niedawna sądzono, że górny odcinek dróg moczowych zdrowych osób jest sterylny. Drogi moczowe to specyficzne środowisko o niskim pH (około 6,0), wysokim stężeniu mocznika oraz innych substancji, które działają hamująco, a czasami bakteriobójczo wobec większości drobnoustrojów. Standardowe metody posiewu moczu opracowane w latach pięćdziesiątych XX wieku uniemożliwiały izolację oraz identyfikację drobnoustrojów należących do naturalnej mikrobioty dróg moczowych, a nawet wielu uropatogenów [49]. Standardowy posiew moczu opierał się głównie na wykorzystaniu podłoża MacConkeya lub agaru z krwią i inkubację w warunkach tlenowych, przez 24 godziny. Wdrożenie ulepszonej ilościowej hodowli moczu (EQUOC) obejmującej posiew większej ilości materiału, większą różnorodność stosowanych podłoży, dłuższą inkubację czy inkubację w warunkach beztlenowych, oraz postęp technik niezależnych od prowadzenia kultur bakteryjnych jak sekwencjonowanie DNA dało możliwość poznania tego bogatego mikrobiologicznie środowiska i lepszej diagnostyki zakażeń dróg moczowych. Analiza metagenomiczna z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (NGS) usprawniła identyfikację drobnoustrojów bytujących w tym środowisku oraz umożliwiła odkrycie mikroorganizmów niehodowlanych. Z kolei obecnie rekomendowany do badania mikrobiologicznego moczu protokół EQUOC wykorzystuje podłoże agarowe z krwią, agar czekoladowy oraz agar CNA z kolistyną, kwasem nalidyksowym oraz 5% krwią. Próby zaleca się inkubować w warunkach tlenowych, mikroaerofilnych oraz beztlenowych, w 35 °C przez 48 godzin [50,51]. Dodatkowo, w rozszerzonym protokole posiewu moczu, wykorzystuje się większe objętości, i posiewa się nie tylko 1 µl jak w przypadku standardowego posiewu, a również objętość 10 µl i 100 µl [52]. Porównanie

standardowego posiewu moczu a rozszerzonego protokołu posiewu jest zobrazowane na Rycinie 3.

Ważnym aspektem przy badaniu moczu jest sposób jego pobrania. Wyróżnia się trzy główne techniki pobierania tego materiału. Pierwsza z nich, najczęściej stosowana w badaniach naukowych, ze względu na małą inwazyjność, polega na pobraniu moczu ze środkowego strumienia. Metoda ta, w szczególności źle wykonana, może nieść za sobą ryzyko zanieczyszczenia takiej próby drobnoustrojami komensalnymi dróg płciowych lub nabłonka dróg moczowych. Kolejna technika polega na pobraniu próby moczu przez cewnik urologiczny. Metoda ta, mimo iż bardziej inwazyjna, nadal nie daje pewności braku zanieczyszczenia próby. Ostatnia metoda to metoda aspiracji nadłonowej, polegająca na nakłuciu pęcherza za pomocą igły przez podbrzusze i aspirację moczu do strzykawki. Z oczywistych przyczyn jest to jednak metoda rzadko wykorzystywana do badania naturalnej mikrobioty dróg moczowych, a większość prac naukowych opiera się na metodzie pobraniu moczu ze środkowego strumienia [50,53].



Rycina 3. Metody izolacji drobnoustrojów z moczu za pomocą standardowego posiewu moczu oraz protokołu rozszerzonego EQUOC. Opracowano na podstawie [50], przy użyciu Biorender.com

Mikrobiota dróg moczowych zdrowych osób nie jest aż tak liczna i zróżnicowana w drobnoustroje jak mikrobiota innych środowisk, przykładowo jelit, i zawiera średnio od 10^4 do 10^5 CFU/ml bakterii w moczu [50]. Mikrobiota ta składa się głównie z drobnoustrojów należących do rodzaju *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Gardnerella*, *Enterococcus* czy *Staphylococcus* [54–56]. Skład mikrobioty jest zależny od wielu zmiennych, takich jak płeć, rasa czy czynniki geograficzne [50]. Według danych literaturowych najbardziej dominującym rodzajem bakterii u kobiet są drobnoustroje należące do rodzaju *Lactobacillus* [54,57,58], a u mężczyzn dominują *Corynebacterium* i *Streptococcus* [57,58], jednakże różnice w składzie pomiędzy płciami są niewielkie [59]. Wśród gatunków *Lactobacillus*, najczęściej izolowanych z dróg moczowych wymienia się natomiast *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* oraz *L. jensenii* [60,61].

Na skład mikrobioty dróg moczowych wpływa również wiek. Wraz z upływem lat obserwuje się spadek różnorodności gatunków bakterii oraz spadek liczebności drobnoustrojów z rodzajów *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Sneathia* oraz *Bacillus* [50]. Z kolei drobnoustroje należące do rodzajów *Jonquetella*, *Parvimonas*, *Proteiniphilum* i *Saccharofermentans* w drogach moczowych są charakterystyczne dla osób powyżej 70 roku życia [62]. Dodatkowo, drobnoustroje z rodzaju *Escherichia* znacznie częściej i liczniej kolonizują drogi moczowe osób starszych, podczas gdy u osób młodszych dominującym i charakterystycznym rodzajem jest *Gardnerella* [50].

Wciąż jeszcze nie ma jednoznacznej odpowiedzi na to jakie jest pochodzenie bakterii obecnych w drogach moczowych. Pierwsza z hipotez zakłada, że pochwa jest głównym źródłem bytujących tam drobnoustrojów. Thomas-White i in. [63] wykazali, że wiele szczepów komensalnych, w tym szczepy *Lactobacillus*, występują zarówno w pęcherzu jak i w pochwie tych samych kobiet. Nie wyjaśnia to jednak pochodzenia urobiomu mężczyzn. Najnowsze badania sugerują, że drobnoustroje dróg moczowych mogą pochodzić z jelit. Dubourg i in. [64] wykazali, że aż 64% gatunków zidentyfikowanych w moczu pokrywa się z gatunkami należącymi do mikrobioty jelitowej a jedynie 31% z gatunkami należącymi do mikrobioty pochwy.

Drobnoustroje należące do naturalnej mikrobioty dróg moczowych charakteryzują się występowaniem specyficznych cech umożliwiającym im kolonizację oraz bytowanie w tym środowisku. Czynniki te obejmują zdolność adhezji komórek bakteryjnych do nabłonka, mechanizmy odporności na warunki stresowe, zdolność

przystosowywania się do specyficznego środowiska żywieniowego gospodarza i sprawną obronę przed konkurującymi z nimi patogenami i systemem immunologicznym gospodarza [65,66]. Ponadto, niektóre drobnoustroje należące do naturalnej mikrobioty dróg moczowych jak *Lactobacillus* czy *Streptococcus* wytwarzają enzymy zdolne do metabolizowania glikozaminoglikanów otaczających nabłonek dróg moczowych, co sprzyja lepszej dostępności cukrów dla przeprowadzania procesów biochemicznych drobnoustrojom komensalnym dróg moczowych [50].

I.5. Charakterystyka *Lactobacillus* spp.

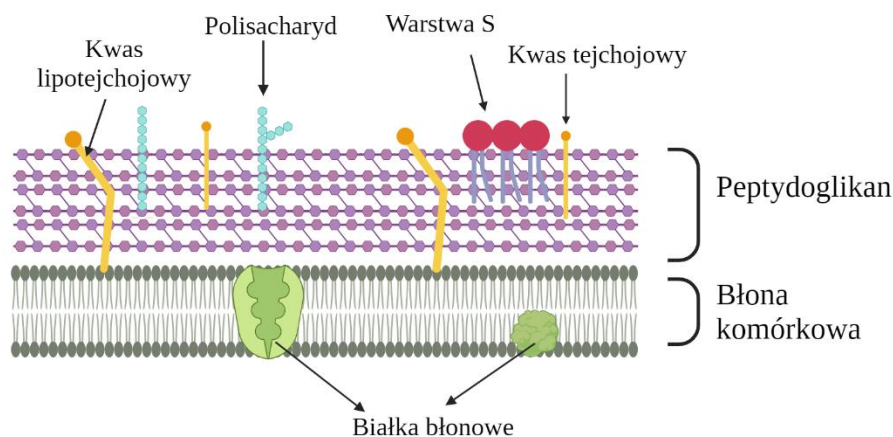
Jednym z głównych przedstawicieli mikrobioty dróg moczowych są drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus*. Są to Gram-dodatnie pałeczki, należące do bakterii fermentacji mlekowej (LAB). To pałeczki mikroaerofilne lub beztlenowe, wymagające pod względem zapotrzebowania na substancje odżywcze. Są organizmami fermentacyjnymi i można je podzielić na szczepy obligatoryjnie homofermentatywne, fakultatywnie heterofermentatywne oraz obligatoryjnie heterofermentatywne. Pierwsze z nich w procesie fermentacji cukru produkują kwas mlekowy (*L. crispatus*, *L. iners*), druga grupa produkuje kwas mlekowy oraz dodatkowo może wytwarzać kwas octowy, etanol i dwutlenek węgla (*L. jensenii*, *L. plantarum*), natomiast produktami fermentacji trzeciej grupy jest zawsze kwas mlekowy, kwas octowy, etanol i dwutlenek węgla (*L. vaginalis*, *L. reuteri*) [67,68].

Ściana komórkowa *Lactobacillus* spp. przedstawiona schematycznie na Rycinie 4, jest zbudowana z wielu warstw peptydoglikanu, który otacza błonę komórkową, kwasy tejchojowe, lipotejchojowe i teichuronowe oraz polisacharydy i białka. Peptydoglikan, który tworzy warstwę sztywną ściany komórkowej, to polimer zbudowany z peptydów oraz cukrów. Część cukrową tworzą reszty N-acetyloglukozaminy oraz kwasu N-acetylmuraminowego połączonych wiązaniem glikozydowym β -(1,4). Utworzone długie łańcuchy polisacharydowe są usieciowane mostkami peptydowymi. Ta struktura pełni kluczowe funkcje, warunkuje integralność komórki bakteryjnej, przyczynia się do utrzymywania zdefiniowanego kształtu komórki, pełni rolę ochronną oraz umożliwia zakotwiczenie białek oraz kwasów tejchojowych [69].

Warstwę plastyczną ściany komórkowej *Lactobacillus* tworzą kwasy tejchajowe, tejchuronowe oraz lipotejchajowe. Są one elementem ściany komórkowej bardzo zróżnicowanym pod kątem struktury, w zależności od szczepu bakteryjnego, pH podłoża oraz źródeł węgla. Mogą stanowić nawet 50% całości ściany komórkowej, zapewniając jej funkcjonalność. Kwasy tejchajowe są polimerami fosforanów glicerolu lub rybitolu, podstawionych resztami glukozy bądź D-alaniny. Zakotwiczone są z peptydoglikanem ściany komórkowej poprzez jednostkę glikozydową, w przeciwieństwie do kwasów lipotejchajowych, które są przyłączone do błony cytoplazmatycznej przez fragment lipidowy. Kwasy tejchuronowe są natomiast zbudowane z powtarzających się podjednostek cukrowych oraz charakteryzują się brakiem reszt fosforanowych [69,70].

Najbardziej zewnętrzną osłonę, występującą u większości gatunków *Lactobacillus*, tworzy warstwa S, zbudowana z wielu identycznych podjednostek białek charakteryzujących się niskimi masami cząsteczkowymi (25-71 kDa) oraz wysokimi wartościami punktu izoelektrycznego pI (9,35-10,40), co nadaje im silnie zasadowy charakter [71]. Ta struktura komórkowa zapewnia kształt komórce, bierze udział w adhezji bakterii do komórek nabłonkowych, autoagregacji oraz koagregacji, stanowi o zmienności antygenowej oraz chroni komórkę bakteryjną przed działaniem dopełniacza oraz fagocytozą. Dodatkowo, chroni komórkę przed stresem osmotycznym, działaniem czynników o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, promieniowaniem oraz bakteriofagami. Mechanizm autoagregacji drobnoustrojów probiotycznych, czyli zdolność do tworzenia agregatów pomiędzy komórkami bakteryjnymi tych samych szczepów, umożliwia skuteczną adhezję i kolonizację organizmu gospodarza drobnoustrojów komensalnych. Dodatkowo, zapewnia również skuteczną barierę przeciwko adhezji bakterii patogennych do nabłonka. Z kolei, mechanizm koagregacji, polegający na tworzeniu agregatów pomiędzy komórkami różnych szczepów oraz gatunków bakterii, umożliwia drobnoustrojów komensalnych skuteczniejsze usuwanie patogenów oraz niedopuszczanie do ich adhezji do komórek nabłonka [72]. W tych procesach pośredniczą białka promujące koagregację Cpf oraz białka Apf, biorące udział w procesach autoagregacji [73]. Białka *Lactobacillus* są podstawowym składnikiem ściany komórkowej pałeczek kwasu mlekowego i nie są one zawsze związane z warstwą S. Mogą być one kowalencyjnie połączone z peptydoglikanem lub połączone z błoną cytoplazmatyczną. Stanowią one receptory dla bakteriocyn oraz bakteriofagów, są zaangażowane w adhezję komórek do powierzchni biotycznych oraz abiotycznych [74].

Polisacharydy są kolejnym składnikiem ściany komórkowej *Lactobacillus*, warunkujące jej właściwości i duże zróżnicowanie w obrębie tego rodzaju. Ze względu na ich położenie wyróżnia się polisacharydy, które są luźno związane z powierzchnią komórki i uwalniane do otaczającego środowiska (EPS), polisacharydy otoczkowe, które są trwale związane z komórką oraz polisacharydy ściany komórkowej. Polisacharydy bakteryjne charakteryzują się dużą różnorodnością wśród szczepów *Lactobacillus* [69,74]. Dzieli się je ze względu na skład cukrów na homopolisacharydy, składające się z jednego rodzaju monosacharydów oraz na heteropolisacharydy, składające się z powtarzających się jednostek zawierających różne monosacharydy. Pełnią one liczne funkcje w interakcjach z gospodarzem, wpływając na adhezję i kolonizację różnych środowisk przez *Lactobacillus* czy immunomodulację. Ponadto wykazują one działanie przeciwbakteryjne a nawet wirusobójcze [75]. Badania Sungur i in. [76] wykazały, że egzopolisacharydy *L. gasseri* izolowane z pochwy mają działanie przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe poprzez indukcję apoptozy komórek raka szyjki macicy.



Rycina 4. Struktura ściany komórkowej *Lactobacillus* spp. Wykonano przy użyciu Biorender.com

Ta zróżnicowana grupa drobnoustrojów występuje powszechnie na powierzchni roślin, psującej się żywności, w odchodach, ściekach, nabłonku ludzkim i zwierzęcym. *Lactobacillus* spp. kolonizują wiele obszarów ludzkiego ciała, w szczególności jamę ustną, jelito kręte, okrężnice czy żeńskie narządy płciowe [67]. Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych nadała im status GRAS (Generally Recognised As Safe), a Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) status „kwalifikowanego

domniemania bezpieczeństwa” (QPS). Z tego względu znalazły one swoje zastosowanie w przemyśle spożywczym, do produkcji żywności fermentowanej oraz przy produkcji probiotyków [77]. Aby dany szczep mógł zostać określony mianem probiotycznego musi spełniać kilka warunków, między innymi musi zostać uznany za skuteczny oraz bezpieczny, być zdolny do przetrwania w przewodzie pokarmowym i w niskim pH żołądka oraz musi wykazywać korzystne działanie dla gospodarza. Obecnie, najszerszej stosowane gatunki probiotyczne to między innymi: *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei* czy *L. gasseri* [67].

Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* posiadają szereg właściwości o charakterze antybakteryjnym czy immunomodulującym. Ich zdolność antagonistyczna wobec patogenów jest ważnym czynnikiem, obejmującym zdolność adhezji do nabłonka lub zmniejszanie stopnia adhezji bakterii chorobotwórczych, agregację i koagregację oraz wytwarzanie substancji o charakterze przeciwdrobnoustrojowym [78]. Powszechnie wiadomo, że szczepy *Lactobacillus* wykazują dobroczynne działanie na układ pokarmowy i żeński układ rozrodczy i odnalazły one swoje zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób tych układów. Przynoszą one liczne, korzystne efekty a należą do nich m.in. łagodzenie nietolerancji laktozy, obniżenie poziomu cholesterolu we krwi, stosuje się je również przy leczeniu chorób biegunkowych czy wrzodów żołądka. Oprócz wyżej wymienionych właściwości, pałeczki kwasu mlekowego wpływają na czynniki wirulencji drobnoustrojów poprzez hamowanie różnych genów kodujących białka, które mają fundamentalne znaczenie w zjadliwości bakterii oraz wykazują działanie przeciwwirusowe poprzez zapobieganie adhezji i namnażaniu się wirusa [79]. Ponadto, ich zastosowanie według wielu danych literaturowych jest jeszcze bardziej wszechstronne i skuteczne w leczeniu takich schorzeń jak atopowe zapalenie skóry [80], czy infekcje górnych dróg oddechowych [81].

W ostatnim czasie coraz szerzej wykorzystywane są również postbiotyki, czyli preparaty zawierające inaktywowane mikroorganizmy i ich produkty metaboliczne, w szczególności wydzielane peptydy, bakteriocyny, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kwasy organiczne czy egzopolisacharydy. Takie środki mają wiele zalet w porównaniu do stosowania probiotyków m.in. brak ryzyka translokacji drobnoustrojów probiotycznych z jelita do krwi u osób z obniżoną odpornością i nabycia genów oporności na antybiotyki. Wyróżniają się również dobrą stymulacją komórek nabłonkowych oraz łatwiejszą ekstrakcją, standaryzacją, transportem

i przechowywaniem. Obecnie te preparaty są coraz częściej obiektem zainteresowań jako skuteczna alternatywa dla probiotyków. [67,82].

I.6. Właściwości antagonistyczne *Lactobacillus* wobec patogenów

Lactobacillus spp. posiadają szereg właściwości, które mają na celu zapewnienie homeostazy w danym środowisku. Główne mechanizmy działania pałeczek kwasu mlekowego wobec bakterii chorobotwórczych zostały zobrazowane na Rycinie 5. Drobnoustroje te oprócz wymienionych już wcześniej właściwości takich jak: wydzielanie substancji o charakterze antybakteryjnym czy wpływ na adhezję patogenów, wykazują mnogość innych czynników, które czynią je drobnoustrojami skutecznymi w walce z patogenami.

Jednym z głównych mechanizmów działania drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* na patogeny jest wydzielanie cząsteczek o charakterze przeciwbakteryjnym, głównie bakteriocyn, nadtlenku wodoru, biosurfaktantów oraz kwasów organicznych.

Bakteriocyny to substancje peptydowe o charakterze antybakteryjnym działające w wąskim spektrum swojej aktywności, hamując wzrost jedynie blisko spokrewnionych gatunków bakterii. Bakteriocyny dzieli się na trzy klasy, pierwsze z nich- lantybiotyki charakteryzują się masą cząsteczkową < 5 kDa i obecnością aminokwasu-lantioniny, druga klasa- to nientybiotyki, termostabilne peptydy, o masie cząsteczkowej < 10 kDa, trzecia klasa natomiast to bakteriocyny o dużej masie cząsteczkowej, termostabilne, o masie > 30 kDa [83]. W warunkach *in vitro*, bakteriocyny *Lactobacillus* wykazują działanie antagonistyczne wobec wielu patogenów m.in. wobec drożdży *Candida albicans* [84], *Staphylococcus aureus* MRSA [85], *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Salmonella typhi* [86]. Powszechnie wykorzystywaną bakteriocyną jest nizinina, wytwarzana przez kilka szczepów *Lactococcus lactis*, stosowana jako środek konserwujący żywność, zwłaszcza przy produkcji serów, gdyż hamuje rozwój bakterii produkujących kwas masłowy [87,88]. Antagonistyczne działanie bakteriocyn opiera się m.in. na zaburzaniu procesu biosyntezy peptydoglikanu, przerywania ciągłości błony komórkowej oraz hamowaniu biosyntezy białek [74,89]. Synergistyczne działanie bakteriocyn w połączeniu z antybiotykami w leczeniu wielu chorób infekcyjnych jest alternatywną metodą terapii, umożliwiającą dużo skuteczniejsze leczenie. [90].

Nadtlenek wodoru to substancja, która pełni rolę czynnika hamującego rozwój bakterii, które nie posiadają mechanizmów ochronnych takich jak wytwarzanie katalazy czy peroksydazy. Pałeczki kwasu mlekowego wytwarzające H_2O_2 , działają bójczo na szerokie spektrum mikroorganizmów jak *Streptococcus agalactiae* [91], *Gardnerella vaginalis* [92] czy *Candida albicans* [93] dzięki zdolności do przenikania przez błony komórkowe.

Biosurfaktanty to związki powierzchniowo czynne, wytwarzane zewnątrzkomórkowo przez *Lactobacillus* lub związane z komórką, mające właściwości przeciwbakteryjne, przeciwbiofilmowe, przeciwadhezyjne i przeciwutleniające. Należą do nich glikolipidy, fosfolipidy, lipopeptydy, kompleksy polisacharydowo-białkowe i wolne kwasy tłuszczowe [94]. Ich właściwości są szeroko badane m.in. w kontekście hamowania tworzenia biofilmów bakteryjnych m.in. na implantach chirurgicznych na modelach *in vivo* [95]. Biosurfaktanty pałeczek kwasu mlekowego określane są jako surlaktyny [96].

Kolejne substancje produkowane przez *Lactobacillus* zewnątrzkomórkowo to kwasy organiczne. Charakteryzują się one działaniem przeciwdrobnoustrojowym w szerokim spektrum oraz są bezpiecznym dodatkiem do żywności, co wykorzystuje się w przemyśle spożywczym. Kwasy organiczne oddziałują na patogeny poprzez zwiększanie przepuszczalności błony bakteryjnej, zakwaszanie cytoplazmy, zwiększanie wewnątrzkomórkowego ciśnienia osmotycznego oraz hamowanie syntezy biomolekuł co prowadzi do śmierci komórek patogenów [97]. Kwas mlekowy jest wytwarzany przez wszystkie pałeczki kwasu mlekowego, jednocześnie drobnoustroje te mogą wytwarzać również kwas cytrynowy, octowy, mrówkowy, bursztynowy, propionowy oraz masłowy [98]. Stężenie oraz rodzaje produkowanych kwasów przez pałeczki kwasu mlekowego jest ściśle zależne od gatunku, warunków oraz środowiska wzrostu. Analiza profilu kwasów organicznych w większości prac obejmuje szczepy *Lactobacillus* izolowane z żywności [99,100], bądź też dotyczy jedynie kwasu mlekowego [101]. Niewiele doniesień naukowych koncentruje się na kwasach wytwarzanych w drogach moczowych. Jednakże, są badania, które wykazały, że kwasy organiczne (kwas cytrynowy, jabłkowy, propionowy, migdałowy, mlekowy, benzoesowy, hipurowy) wykazują działanie bakteriobójcze wobec najczęstszych uropatogenów (*Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) zarówno na formy planktoniczne jak i na biofilm [102].

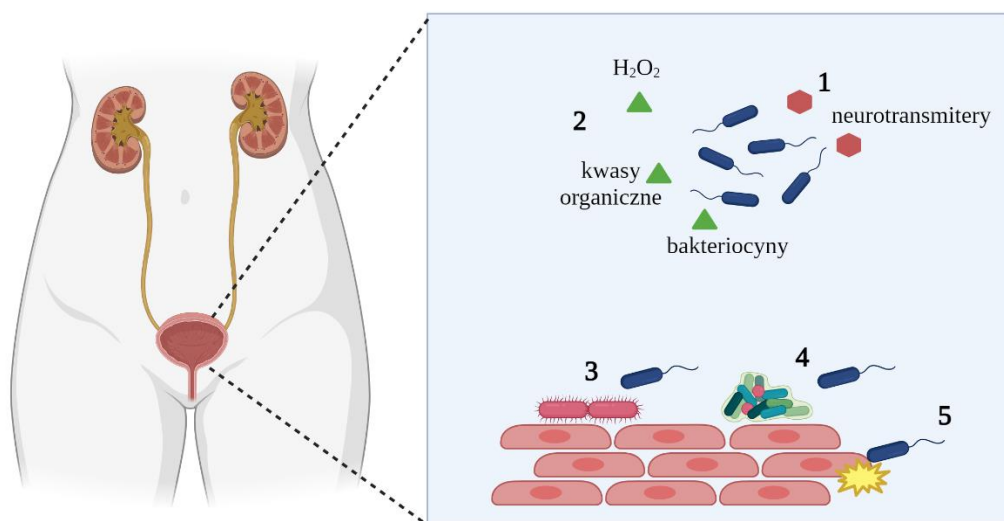
Szczepy probiotyczne, w tym pałeczki kwasu mlekowego, wpływają również na odpowiedź immunologiczną gospodarza, poprzez aktywację limfocytów T, B, makrofagów i komórek NK. Mogą one rekrutować komórki odpornościowe do miejsca zakażenia i indukować specyficzne markery odporności. Stymulują one również komórki odpornościowe do wydzielania czynników prozapalnych (TNF- α , IFN- γ , IL-12) oraz cytokin przeciwzapalnych (IL-10) w sposób specyficzny dla szczepu [103]. Doniesienia na temat działania immunomodulującego szczepów *Lactobacillus* koncentrują się głównie na środowisku jelit. Jednakże i w układzie moczowym, bakterie kwasu mlekowego istotnie wpływają na odpowiedź immunologiczną gospodarza. Komórki nabłonkowe dróg moczowych w odpowiedzi na patogen, wytwarzają substancje rekrutujące komórki odpornościowe jak makrofagi co prowadzi do rozwoju miejscowej odpowiedzi zapalnej, aktywacji kompleksu białkowego NF- κ B, działającego jako czynnik transkrypcyjny i uwolnienia cytokin, między innymi: czynnika martwicy nowotworu TNF- α oraz IL-6, pobudzających procesy zapalne. Karlsson i in. [104] wykazali, że przy jednoczesnej stymulacji komórek pęcherza moczowego *E. coli* oraz *L. rhamnosus* GR-1 aktywacja NF- κ B oraz poziom TNF- α były istotnie wyższe, a uwalnianie cytokiny IL-6 niższe w porównaniu do kontroli. Dodatkowo, badany szczep *Lactobacillus* wpływał na wzrost poziomu receptorów TLR4 rozpoznających wzorce jak LPS Gram-ujemnych patogenów. Wykazano, że pałeczki kwasu mlekowego mogą stymulować układ odpornościowy poprzez ułatwianie rozpoznawania patogenów i pośrednio uczestniczą w eliminacji infekcji.

Pałeczki *Lactobacillus* mogą również wydzielać neurotransmitery takie jak kwas gamma-aminomasłowy (GABA), acetylocholinę czy serotoninę, co oddziałuje na układ nerwowy człowieka. Większość badań dotyczących regulacji produkcji neurotransmiterów dotyczy mikrobioty jelitowej i jej wpływie na regulację aktywności mózgu za pośrednictwem osi jelitowo-mózgowej. Ostatnim trendem są badania nad wpływem mikrobiomu na rozwój chorób neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera i Parkinsona [105].

Kolejnym mechanizmem *Lactobacillus* o działaniu antagonistycznym wobec patogenów jest hamowanie ich adhezji do nabłonka co uniemożliwia im skuteczną kolonizację różnych środowisk, w tym układu moczowego. Wyniki wielu prac wykazują wpływ szczepów *Lactobacillus* na hamowanie adhezji patogenów zarówno do powierzchni abiotycznych jak cewniki [106], jak i do komórek pęcherza moczowego

[107]. Hamowanie tego procesu może zachodzić w trzech wariantach. Pierwszy z nich zakłada mechanizm tzw. wykluczenia, gdy szczepy *Lactobacillus* przylegając do receptorów nabłonkowych blokują miejsca adhezji patogenom. Konkurencja zachodzi wtedy, gdy pałeczki kwasu mlekowego konkurują o miejsca adhezji do nabłonka z patogenem. Z kolei mechanizm wypierania obserwujemy, gdy *Lactobacillus* wypierają patogeny, które już były związane z receptorami komórek nabłonkowych [108].

Lactobacillus wpływają również na tworzenie biofilmu przez patogeny. Hamowanie tworzenia lub wzrostu biofilmu wielu patogenów przez te drobnoustroje, wykazano wobec *Pseudomonas aeruginosa* [109], *Streptococcus mutans* [110], *Listeria monocytogenes* [111], *Staphylococcus aureus* [112] czy *Proteus mirabilis* [94]. Te właściwości mogą być wykorzystywane w ograniczaniu i eliminowaniu biofilmów bakteryjnych na różnych materiałach medycznych np. cewnikach urologicznych.



Rycina 5. Wybrane właściwości antagonistyczne *Lactobacillus* wobec patogenów. 1- produkcja neurotransmiterów, 2- produkcja substancji przeciwdrobnoustrojowych, 3- hamowanie adhezji patogenów do nabłonka, 4- hamowanie wzrostu oraz tworzenia biofilmu, 5- stymulacja układu immunologicznego gospodarza. Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* oznaczone zostały kolorem **niebieskim**, a uropatogeny kolorem **różowym**. Opracowano na podstawie [119], przy użyciu Biorender.com

Oprócz wymienionych powyżej właściwości antagonistycznych wobec patogenów, drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* posiadają również zdolność do oddziaływania i wchodzenia w interakcję z wieloma metalami ciężkimi, pestycydami, monomerami tworzyw sztucznych i związkami organicznymi. Wyniki wskazują, że są one zdolne do usuwania i degradowania takich toksyn jak mykotoksyny [113], aflatoksyny [114], ochratoksyny [115] oraz metali ciężkich jak: rtęć, ołów, kadm, miedź, cynk, żelazo [116–118].

I.7. Dysbioza mikrobiomu układu moczowego

Naturalna mikrobiota dróg moczowych poprzez wiele mechanizmów działania na patogeny wpływa na utrzymanie homeostazy i prawidłowego funkcjonowania tego środowiska. Mikrobiota dróg moczowych bogata w drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* jest powiązana z prawidłowo funkcjonującym układem moczowym co warunkuje ochronę przed ZUM i chorobami związanymi z układem moczowym [120]. Zaburzenia składu naturalnej mikrobioty dróg moczowych objawiające się w postaci spadku różnorodności oraz liczności drobnoustrojów komensalnych może prowadzić do nadmiernego rozwoju bakterii chorobotwórczych i rozwoju chorób układu moczowego. Może być wiele przyczyn rozwoju dysbiozy mikrobioty dróg moczowych a jedną z nich jest powszechnie stosowana przy infekcjach układu moczowego, antybiotykoterapia. Zjawisko wpływu antybiotyków na skład drobnoustrojów mikrobioty jelit jest dobrze poznane, z kolei temat wpływu leków przeciwdrobnoustrojowych na mikrobiotę dróg moczowych nadal pozostaje tematem szerokich rozważań [121]. Mimo to, badania wskazują, że antybiotykoterapia istotnie ogranicza liczebność drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus*, co prowadzi do rozwoju patogenów m.in. *E. coli*, który stanowi najliczniejszy gatunek bakterii w drogach moczowych po zażywaniu leków przeciwdrobnoustrojowych [122]. Badania przeprowadzone przez Ceprnja i in. [123] potwierdziły negatywny wpływ antybiotyków na różnorodność mikrobioty dróg moczowych, w szczególności na liczebność *Lactobacillus* oraz wykazały większe predyspozycje do zapaleń pęcherza moczowego przy dysbiozie tego środowiska. Mimo tego, antybiotykoterapia jest przepisywana przez lekarzy w leczeniu ZUM najczęściej bez posiewów mikrobiologicznych moczu, co skutkuje nieskutecznym leczeniem i wzrostem oporności bakterii na antybiotyki. Kolejnymi czynnikami wpływającymi na spadek różnorodności oraz liczebności drobnoustrojów komensalnych w drogach

moczowych jest wiek oraz poziom estrogenów [78]. Wysoki poziom tych hormonów wspiera rozwój drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* w młodym wieku oraz podczas ciąży [60].

Dysbioza urobiomu jest powiązana z wieloma chorobami układu moczowego jak ZUM, przewlekła choroba nerek, nietrzymanie moczu, rak pęcherza czy kamica nerkowa [50,121]. Wykazano, że liczba pałeczek kwasu mlekowego w drogach moczowych u kobiet z nawracającymi infekcjami układu moczowego jest istotnie niższa niż u kobiet zdrowych [124]. Jednakże, co ciekawe nie wszystkie gatunki *Lactobacillus* można zawsze powiązać ze zdrowym składem mikrobioty dróg moczowych. Wskazuje się, że *L. crispatus* jest charakterystycznym gatunkiem w przypadku zdrowej mikrobioty, z kolei *L. gasseri* występuje częściej przy stanach chorobowych UM jak nietrzymanie moczu [50], a przewaga *L. iners* ze zwiększoną podatnością na zakażenia układu moczowego [60].

Dysbiozie naturalnej mikrobioty dróg moczowych przypisuje się również udział w rozwoju raka pęcherza, gdyż jednym z czynników ryzyka są nawracające i nieleczone infekcje układu moczowego. Badania Wu i in. [125] wykazały w moczu pacjentów chorujących na raka pęcherza, dominację drobnoustrojów patogennych, głównie *Acinetobacter*, *Anaerococcus*, *Herbaspirillum*, *Porphyrobacter*, *Bacteroides* i *Staphylococcus*, które promują stan zapalny, co może odgrywać rolę w karcynogenezie. Warto jednak podkreślić, że obecna wiedza dotycząca wpływu zaburzenia równowagi naturalnej mikrobioty na raka pęcherza moczowego nadal jest znikoma, a większość opublikowanych badań została przeprowadzona na małej grupie uczestników.

Badania dotyczące znaczenia naturalnej mikrobioty dróg moczowych w rozwoju kamieni moczowych, dotyczą głównie kamicy szczawianowo-wapniowej lub fosforanowo-wapniowej. Spadek różnorodności i liczebności naturalnej mikrobioty dróg moczowych może promować rozwój uropatogenów a tym samym rozwój różnych typów kamicy moczowej. Co ciekawe, drobnoustroje z rodziny Enterobacteriaceae i Morganellaceae, są izolowane ze wszystkich typów kamieni, nie tylko struwitowych, ale również szczawianowo-wapniowych oraz fosforanowo-wapniowych [126]. Badania Barr-Beare i in. wykazały, że bakterie, najczęściej *E.coli*, są izolowane nawet z 32% wszystkich kamieni szczawianowo-wapniowych. Zaobserwowano również, że u myszy z tym typem kamicy zainfekowanych *E. coli*, drobnoustroje te intensyfikowały agregację kryształów [127]. Antybiotykoterapia, która jest konieczna w leczeniu kamieni

struwitowych ma ogromny wpływ na skład urobiomu i nasila dysbiozę tego środowiska. Prowadzi to do częstszych nawrotów choroby i tworzenia się kamieni moczowych na nowo.

I.8. Drobnoustroje *Lactobacillus* w leczeniu ZUM oraz chorób związanych z układem moczowym

Szczepy probiotyczne, w tym drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* są tematem szeroko omawianym w kontekście ich wykorzystania w alternatywnym leczeniu chorób układu moczowego. Standardowe metody leczenia ZUM, wykorzystujące jedynie antybiotykoterapię do zwalczania patogenów, skutkują zniszczeniem naturalnej bariery w postaci komensalnej mikrobioty dróg moczowych. Z tego względu, poszukuje się innych, naturalnych możliwości leczenia chorób związanych z tym układem.

Wykorzystanie szczepów *Lactobacillus* we wspomaganiu leczenia chorób układu moczowego bada się pod wieloma aspektami, zarówno w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Trwają badania nad ich wykorzystaniem w leczeniu lub wspomaganiu terapii takich chorób jak zakażenia układu moczowego, rak pęcherza czy kamica moczowa. Testuje się również ich skuteczność w połączeniu z innymi środkami na przykład antybiotykami czy żurawiną. Istotny wydaje się również aspekt ich drogi podania, co może mieć wpływ na skuteczność kolonizacji danego środowiska.

Właściwości antagonistyczne drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* są wykorzystywane w walce z patogenami różnych środowisk. Drobnoustroje te oddziałują na mikroorganizmy chorobotwórcze w warunkach *in vitro*, co zostało szeroko udokumentowane, ale wykazują również skuteczność w badaniach na modelach zwierzęcych. Zespół badawczy Fraga i in. [128] wykazał, że w warunkach *in vivo*, zwierzęta poddane suplementacji szczepami *L. murinus*, wykazywały mniejszą liczbę *P. mirabilis* w nerkach oraz pęcherzu moczowym w porównaniu do myszy nieleczonych. Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* można również stosować w połączeniu z obecnie używanymi terapeutykami, wykorzystując zjawisko synergizmu. Szczepy *Lactobacillus* wykazujące działanie antagonistyczne wobec patogenów, w połączeniu z terapią antybiotykową powodują zmniejszenie częstości nawrotów zakażeń układu moczowego [129]. Jednakże, co ciekawe, szczepy *Lactobacillus* w połączeniu z suplementacją żurawiną, której właściwości zapobiegające rozwojowi zakażeń dróg moczowych

zostały już dobrze poznane, okazują się być w wielu przypadkach nieskuteczne, w kontekście zapobiegania rozwojowi ZUM [130,131]. Interesujące wyniki dotyczące wpływu bakterii probiotycznych oraz wytwarzanych przez nie składników zewnątrzkomórkowych na zapalenie pęcherza moczowego przyniosły badania Swidsinski i in. [132]. Wyniki tej pracy wskazały, że aplikowany dopochwowo żel z kwasem mlekowym, czyli jednym z głównych substancji wytwarzanych zewnątrzkomórkowo przez *Lactobacillus*, wykazuje działanie bakteriostatyczne wobec *E. coli* oraz ma wpływ na zmianę ich morfologii, co skutkowało zmniejszeniem objawów zapalenia pęcherza moczowego u ponad połowy pacjentów. Podobne wyniki przedstawił zespół Diebold i in. [133] który wykazał, że stosowanie żelu z kwasem mlekowym korzystnie wpływa na zdrowie dróg moczowych i obniża częstość infekcji tego układu.

Wiele doniesień naukowych wykazuje również skuteczność *Lactobacillus* w leczeniu raka pęcherza czy kamicy nerkowej. Wykazano, że szczepy *L. rhamnosus* GG i *L. casei* Shirota posiadają zdolność zabijania komórek nowotworowych raka pęcherza poprzez indukowanie apoptozy, z kolei *L. acidophilus* wykazuje synergistyczne działanie wraz z terapią BCG zwiększając ekspresję cytokiny TNF- α oraz ekspresję pro-apoptotycznego białka Bax [134]. Stosowanie organizmów probiotycznych, w tym drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* w leczeniu oraz zapobieganiu kamicy moczowej również przynosi korzystne efekty. Badania dotyczą jednak głównie kamicy szczawianowo-wapniowej, brak jest rzetelnych danych dotyczących wpływu pałeczek kwasu mlekowego na powstawanie infekcyjnych kamieni moczowych.

Sposób podania szczepów potencjalnie probiotycznych ma również istotny wpływ na kolonizację układu moczowego oraz efektywność w leczeniu lub też wspomaganiu leczenia chorób układu moczowego. Badania wskazują, że zarówno podanie doustne jak i podanie dopochwowe badanych szczepów umożliwia długotrwałą kolonizację układu moczowego przez bakterie komensalne, co zmniejszało częstość występowania ZUM [135,136]. Alternatywną drogą podania organizmów probiotycznych jest bezpośrednie wkroplenie do pęcherza moczowego, przykładowo przez cewnik. Mimo iż jest to metoda najskuteczniejsza, umożliwiającą bezpośrednią kolonizację tego środowiska, jednocześnie jest możliwa do wykonania przede wszystkim w warunkach klinicznych, co stanowi znaczne ograniczenie stosowania tej

metody [137]. Jak wykazały badania Forster i in. [138] ten rodzaj terapii jest bezpieczną metodą w leczeniu dysfunkcji pęcherza neurogennego.

II. Cel pracy

Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* należą do naturalnej mikrobioty dróg moczowych zdrowych ludzi. Pomimo coraz szerszej wiedzy na temat wpływu *Lactobacillus* spp. na zdrowie układu moczowego, nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. W szczególności, brak jest doniesień dotyczących wpływu drobnoustrojów komensalnych dróg moczowych na patogeny *P. mirabilis*, powodujące zakażenia układu moczowego oraz odpowiadające za tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych.

Celem eksperymentalnej części pracy była ocena wpływu drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus*, należących do naturalnej mikrobioty dróg moczowych na patogenność *P. mirabilis* oraz tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych *in vitro*. W toku badań analizowano wpływ szczepów *Lactobacillus* na każdy etap ich tworzenia: adhezję uropatogenów do nabłonka, wrażliwość na czynniki antybakteryjne *Lactobacillus*, krystalizację składników mineralnych moczu oraz agregację powstałych kryształów.

II.1. Realizacja zadań badawczych

1. Izolacja oraz identyfikacja bakterii z rodzaju *Lactobacillus* z dróg moczowych zdrowych ludzi oraz ocena ich właściwości antybakteryjnych wobec *P. mirabilis*.

Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* izolowano z moczu zdrowych osób i identyfikowano za pomocą metody spektrometrii mas MALDI/TOF. Szczepy *P. mirabilis* należały do Kolekcji Szczepów Katedry Biologii Bakterii i wyizolowane zostały z moczu osób ze zdiagnozowaną kamicą moczową oraz z kamieni moczowych. Działanie antybakteryjne dziewięciu klinicznych oraz dwóch referencyjnych szczepów *Lactobacillus* wobec ośmiu badanych szczepów *P. mirabilis* oceniano za pomocą metody mikrorozcieńczeń oraz metody dyfuzji, wykorzystując supernatanty *Lactobacillus*. Supernatanty były alkalizowane do pH 6,0, poddane działaniu katalazy bądź wysokiej temperatury, a jeden z nich pozostał niczym nietraktowany co umożliwiło wskazanie jakie substancje wydzielane przez *Lactobacillus* mają najsilniejsze działanie

antybakteryjne wobec badanych szczepów *P. mirabilis*. Analizy LC-MS/MS oraz metoda kolorymetryczna umożliwiły zidentyfikowanie jakościowe oraz ocenę ilościową kwasów organicznych wytwarzanych przez szczepy *Lactobacillus*. W toku badań, oceniano również wpływ kwasów organicznych na wzrost *P. mirabilis* za pomocą metody spektrofotometrycznej oraz ich wpływ na tworzenie biofilmu za pomocą testu MTT. Ponadto, w celu wykazania mechanizmu działania kwasów organicznych w kontekście ich przeciwbakteryjnych właściwości, oceniano stan błony komórkowej *P. mirabilis* po inkubacji z kwasami z użyciem metody spektrofotometrycznej z jodkiem propidyny.

Wyniki tej części pracy zostały opublikowane w **Publikacji 1**.

2. Ocena intensywności krystalizacji mineralnych składników moczu w hodowlach mieszanych *P. mirabilis* i *Lactobacillus*.

Krystalizacja składników moczu wraz z tworzeniem kryształów struwitu oraz apatytu jest jednym z pierwszych etapów powstawania infekcyjnych kamieni moczowych. Ocenę intensywności krystalizacji oceniano na modelu *in vitro*, z użyciem moczu syntetycznego w wybranych punktach czasowych (0, 3, 6, 8 i 24 godz.). Stopień krystalizacji w układach kontrolnych, z czystymi hodowlami *P. mirabilis*, oraz badanych, ze szczepami *Lactobacillus*, określano za pomocą stężenia jonów wapnia i magnezu, metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej oraz za pomocą obserwacji kryształów pod mikroskopem kontrastowo-fazowym. Dodatkowo, oceniano również żywotność bakterii *P. mirabilis* (CFU/ml), mierzono pH oraz uwalnianie amoniaku za pomocą metody fenolowo-podchlorynowej.

Wyniki tej części pracy zostały opublikowane w **Publikacji 2**.

3. Ocena wpływu szczepów *Lactobacillus* na aktywność ureazy *P. mirabilis*.

Wpływ szczepów *Lactobacillus* i kwasu mlekowego na aktywność ureazy oceniano za pomocą metod spektrofotometrycznych, z użyciem moczu syntetycznego z czerwienią fenolową oraz ureazą z fasoli *Canavalia ensiformis*.

Typ inhibicji enzymu określono w badaniach kinetyki enzymatycznej, które wykonywane były za pomocą pomiaru uwalniania amoniaku metodą fenolowo-podchlorynową, w układzie z szerokim zakresem stężeń mocznika, ureazą z fasoli oraz kwasem mlekowym, którego stężenia odpowiadały wartościom IC₂₅, IC₅₀ i IC₇₅. Dokowanie *in silico* kwasu mlekowego, przeprowadzono w programie Autodoc 4.2.6 dla modelu 3D kwasu L(+) mlekowego i modelu struktury krystalograficznej ureazy *Canavalia ensiformis*.

Wyniki tej części pracy zostały opublikowane w **Publikacji 2**.

4. Ocena wpływu substancji zewnątrzkomórkowych *Lactobacillus* na krystalizację, adhezję bakterii i kryształów do nabłonka pęcherza moczowego oraz cytotoksyczność indukowaną szczepami *P. mirabilis* wobec komórek pęcherza moczowego.

Wpływ substancji zewnątrzkomórkowych *Lactobacillus* na krystalizację, adhezję oraz cytotoksyczność oceniano z użyciem insertów z poliwęglanową membraną o średnicy porów 0,4 µm, która umożliwiała swobodną dyfuzję produktów przemiany materii *Lactobacillus*, jednocześnie zapobiegając mieszaniu się komórek bakteryjnych. Intensywność krystalizacji oceniano za pomocą analizy stężenia jonów Ca²⁺, Mg²⁺ z użyciem metody absorpcyjnej spektrometrii atomowej oraz obserwacji kryształów pod mikroskopem kontrastowo fazowym. Dodatkowo, oceniano stężenia uwalnianego amoniaku, metodą fenolowo-podchlorynową. Powyższe metody zostały użyte również do określenia wpływu substancji zewnątrzkomórkowych *Lactobacillus* na krystalizację związaną z nabłonkiem pęcherza moczowego (HCV-29), gdzie dodatkowo wykonano szerszą analizę mikroskopową, wykonując barwienia Von Kossa oraz obrazując zjawisko autofluorescencji kryształów z użyciem mikroskopii konfokalnej. Cytotoksyczność wobec komórek pęcherza moczowego indukowaną szczepami *P. mirabilis* oceniano za pomocą testów LDH oraz MTT. Wpływ substancji wydzielanych przez *Lactobacillus* na adhezję pałeczek *P. mirabilis* do komórek nabłonka pęcherza oceniano za pomocą wartości CFU/ml po lizie komórek eukariotycznych oraz metod mikroskopowych z użyciem fioleto krystalicznego. Oceniano również stężenie

kwasy L-mlekowego, D- mlekowego oraz bursztynowego przez *L. jensenii* oraz *L. gasseri* za pomocą metod spektrofotometrycznych, z użyciem zestawów komercyjnych.

Wyniki tej części pracy zostały opublikowane w **Publikacji 3**.

5. Ocena agregacji kryształów struwitu w obecności substancji zewnątrzkomórkowych *Lactobacillus* oraz rola w tym procesie substancji pochodzenia bakteryjnego.

Wpływ wyizolowanych zewnątrzkomórkowych białek oraz cukrów *L. jensenii* oraz *L. gasseri* na agregację kryształów struwitu oceniano za pomocą pomiaru potencjału zeta oraz zliczeniu pól powierzchni otrzymanych agregatów z użyciem metod mikroskopowych. Białka izolowano za pomocą metody z siarczanu amonu, a polisacharydy wytrącano 96% etanolem. Kryształy struwitu otrzymywano metodą chemiczną, z użyciem 1,2 M NH_3 .

Wyniki tego celu szczegółowego stanowią **wyniki nieopublikowane**, opisane w Rozdziale IV niniejszej rozprawy.

III. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej

III.1. Publikacja 1

Szczerbiec D., Piechocka J., Głowacki R., Torzewska A. *Organic acids secreted by Lactobacillus ssp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic Proteus mirabilis*. Molecules. 2022, 27, 5557.
doi:10.3390/molecules27175557

Article

Organic Acids Secreted by *Lactobacillus* spp. Isolated from Urine and Their Antimicrobial Activity against Uropathogenic *Proteus mirabilis*

Dominika Szczербiec ¹, Justyna Piechocka ², Rafał Głowacki ² and Agnieszka Torzewska ^{1,*}

¹ Department of Biology of Bacteria, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

² Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163/165, 90-236 Lodz, Poland

* Correspondence: agnieszka.torzewska@biol.uni.lodz.pl

Abstract: The natural microbiota of the urinary tract includes *Lactobacillus* spp., which secrete molecules with antimicrobial properties and have antagonistic activity against many pathogens. This paper focuses on the antibacterial effect of *Lactobacillus* strains isolated from urine against clinical strains of *Proteus mirabilis* isolated from kidney stones and from urine with coexisting urolithiasis. The study involved analyzing the main antimicrobial molecules secreted by *Lactobacillus*. In order to indicate which agent had the strongest antimicrobial effect, the supernatants were made alkaline and treated with catalase and high temperature. Both treated and untreated supernatants were analyzed for their activity. Exposing uropathogens to all untreated cell-free supernatants of *Lactobacillus* significantly reduced their growth, and it was established that these properties were related to organic acid secretion by these strains. Using LC–MS/MS and spectrophotometric techniques, lactic, citric, and succinic acids were determined qualitatively and quantitatively. The influence of these acids on the *P. mirabilis* growth and biofilm formation and their influence on membrane permeability were also investigated. The results indicate that organic acids secreted by *Lactobacillus* strains have a high antibacterial potential and could be used as novel agents in the treatment of urinary tract infections caused by *P. mirabilis*.

Keywords: organic acids; *Lactobacillus*; *Proteus mirabilis*; microbiota; antibacterial activity



Citation: Szczerbiec, D.; Piechocka, J.; Głowacki, R.; Torzewska, A. Organic Acids Secreted by *Lactobacillus* spp. Isolated from Urine and Their Antimicrobial Activity against Uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Molecules* **2022**, *27*, 5557. <https://doi.org/10.3390/molecules27175557>

Academic Editor: Athina Geronikaki

Received: 26 July 2022

Accepted: 25 August 2022

Published: 29 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The genus *Lactobacillus* belongs to the group of lactic acid bacteria (LAB), which consists of a large and diverse spectrum of bacterial species. In general, these bacteria are nonpathogenic, microaerophilic, catalase-negative, Gram-positive rods [1]. It is well known that *Lactobacillus* spp. are part of the normal human microbiota, mainly of the healthy female genital tract [2,3]. Recently, these bacteria have been shown to be an important component of the urinary tract microbiota. The urinary tract used to be considered a sterile environment. However, molecular biology techniques and novel culture methods have allowed isolating and characterizing healthy human urinary tract microbiota [4,5]. The urinary tract and urine are the habitat of microorganisms, mainly *Lactobacillus* and *Streptococcus*, in addition to microbes of the genera *Gardnerella*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, and *Sneathia*, playing a protective role against pathogens [6,7]. The microbiota of the genitals and urinary tract consist of highly similar strains of health-associated commensal bacteria and, as reported in the literature, the most common *Lactobacillus* strains isolated from urine and bladder belonging to *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, and *L. jensenii* species [5,7].

Lactobacillus bacteria are believed to have probiotic properties, and they modulate the host immunity. Their antimicrobial activity against many pathogens, including those

causing urinary tract infections (UTIs), has been comprehensively demonstrated. *Lactobacillus* species produce antibacterial compounds such as biosurfactants, bacteriocins, hydrogen peroxide, and organic acids [8,9]. The production of bacteriocins by *Lactobacillus* and their antibacterial properties against many pathogenic bacteria have been widely explored [10–12]. Similarly, their ability to produce hydrogen peroxide and their impact on pathogen growth inhibition have also been described [13,14]. However, in many cases, the antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains is associated with organic acid production. The most common organic acids found in the fermentation broth include lactic acid, citric acid, acetic acid, butyric acid, and propionic acid in the case of *L. plantarum* and *L. crispatus* strains [15,16]. Despite the fact that, recently, more attention has been paid to the microbiota of the urinary tract, there are not enough reports regarding strains isolated from the urinary tract and interactions between the natural microbiota of the urinary tract and uropathogens.

One of the pathogens frequently causing urinary tract infections (UTIs), especially those in long-term catheterization patients, is *Proteus mirabilis*. *Proteus* spp. belong to the family Morganellaceae, widely existing both in the natural environment and as part of the human microbiota, predominantly as a commensal of the gastrointestinal tracts of human and animals. *P. mirabilis* is well known due to its virulence factors such as urease, an enzyme that can hydrolyze urea into ammonia and carbon dioxide, which raises the urine pH to facilitate the formation of kidney stones, as well as swarming motility and the presence of fimbriae and flagella. Due to the difficulties in combating *Proteus* infections, there is a risk of permanent renal damage and urinary stone formation, which may progress to bacteremia and sepsis [17,18]. The treatment of patients with UTIs is long-term and often ineffective, consisting mainly of the use of antibiotics. It should be emphasized that UTIs are at the forefront of the antibiotic resistance problem. A common problem is also the formation of a bacterial biofilm on urinary catheters by urease-positive *P. mirabilis*. Accumulation of calcium and magnesium ions may occur in the biofilm, which, in combination with the activity of urease, causes the formation of crystals and incrustation of the urinary catheter, possibly leading to its blockage [19]. Thus, there is an urgent need to develop alternative therapeutics for the treatment of UTIs. The natural microbiota of the urinary tract can be a source of strains antagonistic to uropathogenic bacteria. Those strains or the antibacterial substances secreted by them can be used to treat or prevent UTIs [20].

The present paper was designed to expand the knowledge on the interactions between the existing members of the beneficial host urinary tract microbiota and uropathogens. The study focused on the substances with antibacterial properties excreted by lactobacilli and their characteristics. The purpose of this work was to determine the antibacterial effect of *Lactobacillus* species isolated from urine on one of the most common UTI etiological agents—*P. mirabilis*.

2. Results

2.1. Antibiotic Susceptibility Profile of *Proteus Mirabilis* Strains

An antibiotic susceptibility test was carried out on eight strains of *P. mirabilis* with 15 antibiotics used in the treatment of patients with urinary tract infections including penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams, fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, and nitrofurans. As shown in Table 1, most of the tested strains were resistant to ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefotaxime, gentamicin, and nitrofurantoin. Two of the eight tested strains (*P. mirabilis* 608/221 and 1090) were multidrug-resistant bacteria. The most effective antibiotics were imipenem and norfloxacin, to which all tested strains were sensitive.

Table 1. Antibiotic susceptibility of *P. mirabilis* strains.

Antibiotic Used	Resistant Strains	% of Resistance
Ampicillin	K0; KP; 1090; 1567; 5628; 608/221	75%
Ampicillin/sulbactam	K0; KP; 1090; 1567; 5628; 608/221	75%
Piperacillin/tazobactam	1090; 608/221	25%
Cefepime	1090; 5628; 608/221	38%
Cefotaxime	KP; 1090; 1567; 5628; 608/221	63%
Ceftazidime	KP; 1090; 5628; 608/221	50%
Imipenem	-	0%
Meropenem	KP	13%
Aztreonam	-	0%
Ciprofloxacin	608/221	13%
Norfloxacin	-	0%
Amikacin	KP	13%
Gentamicin	K0; KP; 1090; 1567; 5628; 608/221	75%
Tigecycline	1090; 608/221	25%
Nitrofurantoin	K0; K5/MC1; K8/MC; 1090; 1567	63%

2.2. Antibacterial Effect of *Lactobacillus* CFSs on Pathogenic *P. mirabilis* Strains

Lactobacillus species exhibit certain antimicrobial mechanisms, and one of them is the production of antimicrobial substances including organic acids, hydrogen peroxide, and bacteriocins. In the well diffusion assay, the influence of cell-free supernatants (CFSs) of *Lactobacillus* on *P. mirabilis* growth inhibition was assessed. As presented in Figure 1, untreated CFSs of all nine *Lactobacillus* isolates and reference strains significantly inhibited the growth of most *P. mirabilis* bacteria (all $p < 0.05$). They showed average growth inhibition at the level 10–15 mm. However, the degree of antagonism varied among the *Lactobacillus* strains. *L. crispatus* (1.2; 4; 6.2) was the most effective, while *L. jensenii* (22.2) and the reference strain of *L. crispatus* were the weakest. As shown in Figure 1, only *L. jensenii* 22.2 and *L. crispatus* ATCC 33197 did not exhibit antibacterial activity against all of the pathogenic bacteria. It is worth noting that, in most cases, the antimicrobial effect was not observed in supernatants treated with 1 M NaOH. Only the CFS of *L. crispatus* 1.2 neutralized to pH 6.0 inhibited the growth of *P. mirabilis* KP.

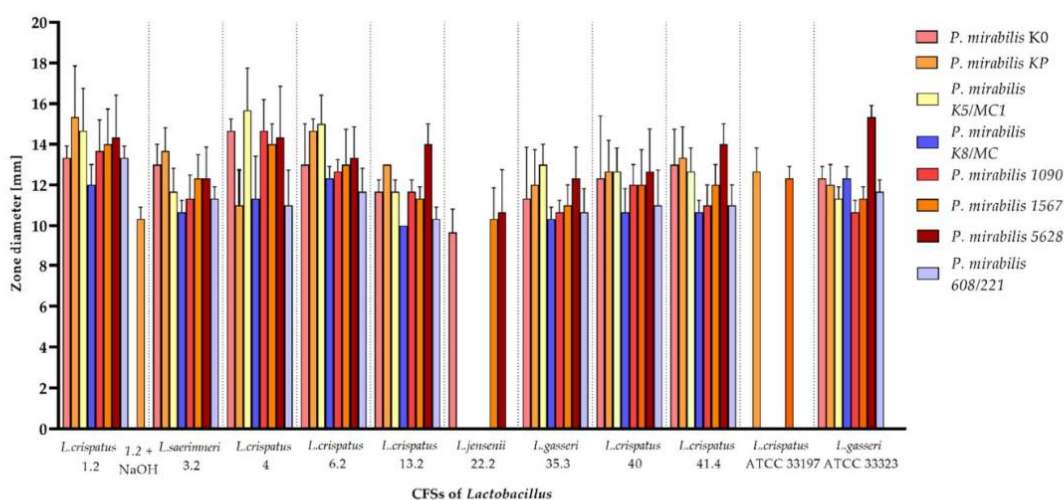


Figure 1. Zone of inhibition of *Lactobacillus* strains against *P. mirabilis* according to well diffusion assay. The data of CFSs treated with NaOH (excluding *L. crispatus* 1.2) are not shown due to the lack of *Proteus* growth inhibition. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments. All the results are statistically significant ($p < 0.05$), according to U Mann–Whitney test.

Similarly, in the broth microdilution assay (Table 2), untreated CFSs showed a significantly strong inhibition effect on the growth of *P. mirabilis* (all $p < 0.05$). The greatest activity against pathogenic strains, with the percentage range of growth inhibition 62–99%, was observed in nine isolates (*L. crispatus* 1.2, 4, 13.2, 40, 41.4, *L. saerimneri* 3.2, *L. gasseri* 35.3, and two references strains *L. gasseri* ATCC 33323 and *L. crispatus* ATCC 33197), in contrast to the supernatants of *L. crispatus* 6.2 and *L. jensenii* 22.2, which showed the lowest percentage of *P. mirabilis* growth inhibition (62–79%).

Table 2. The percentages of *P. mirabilis* isolate growth inhibition according to broth microdilution method. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments. All the results are statistically significant ($p < 0.05$) according to Cochran's Q test.

<i>P. mirabilis</i> Strains	1.2	3.2	4	6.2	13.2	22.2	35.3	40	41.4	ATCC 33197	ATCC 33323
K0	98%	98%	95%	79%	97%	73%	97%	97%	97%	98%	100%
KP	97%	98%	95%	74%	96%	64%	96%	96%	97%	98%	100%
K5/MC1	97%	97%	93%	72%	72%	95%	72%	94%	95%	96%	100%
K8/MC	98%	99%	94%	69%	96%	65%	96%	96%	96%	97%	100%
1090	97%	98%	95%	65%	96%	70%	96%	96%	96%	97%	100%
1567	98%	98%	95%	66%	97%	62%	96%	96%	97%	97%	100%
5628	97%	97%	93%	92%	95%	69%	95%	89%	95%	96%	100%
608/221	97%	98%	94%	63%	95%	69%	95%	91%	96%	96%	99%

As already mentioned, untreated supernatants exhibited the highest antimicrobial activity. On the other hand, the other three supernatants (treated with catalase, neutralized to pH 6.0, and heated) also showed an inhibitory effect, albeit with up to twofold lower efficiency, with a maximum value of 55% (Figure 2). The results of growth inhibition of *P. mirabilis* strains were at a similar level across trials with supernatants treated with different factors. However, when comparing the data obtained for individual *P. mirabilis* strains with different supernatants of *Lactobacillus* strains, differences were visible. The *P. mirabilis* KP strain exhibited the lowest inhibition, while strain 5628 showed the highest percentage growth inhibition by all tested supernatants. Low antibacterial properties of *L. crispatus* 40, treated with all factors, against all *Proteus* strains were also observed.

All these results indicate that organic acids secreted by *Lactobacillus* had the strongest impact and were the main factors inhibiting the growth of *Proteus*. However, it is worth noting that other substances produced by lactobacilli such as hydrogen peroxide and bacteriocins may also influence the antibacterial effect of *Lactobacillus* although to a lesser extent than organic acids.

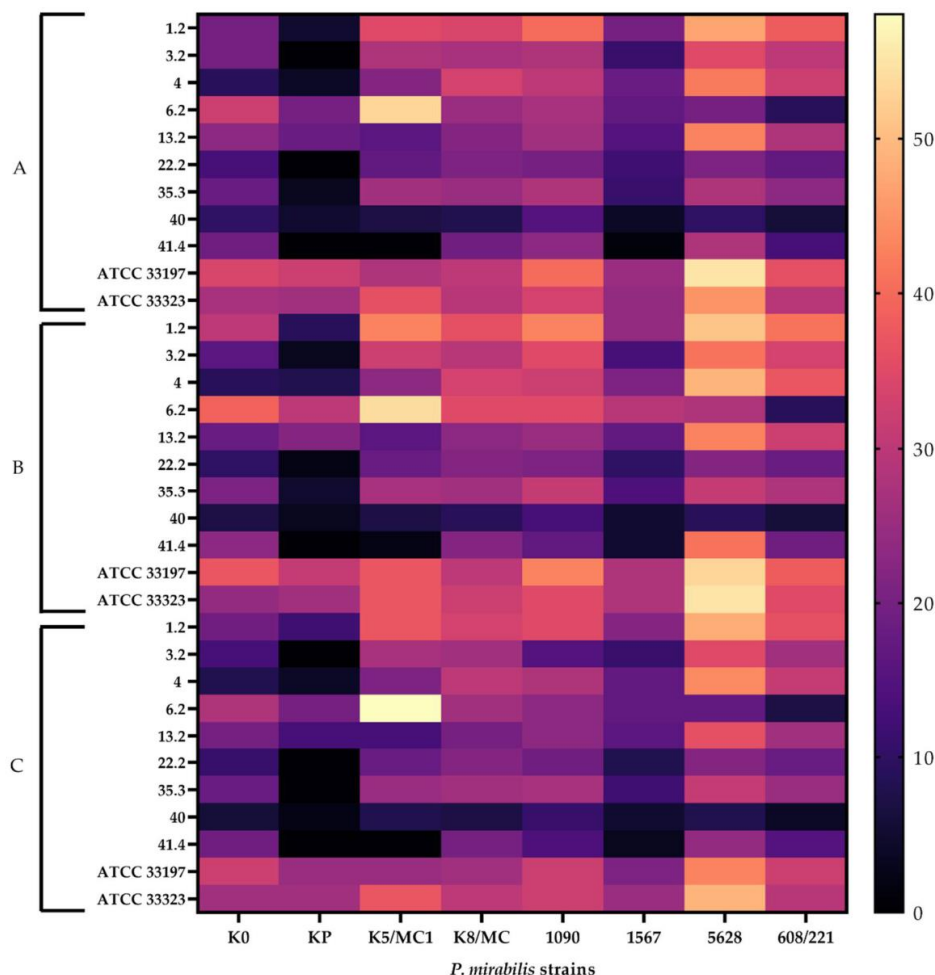


Figure 2. Heatmap of the *P. mirabilis* strain growth inhibition by cell-free *Lactobacillus* supernatants treated with different factors, expressed as percentages. (A) Supernatants neutralized to pH 6.0 and heated. (B) Supernatants only neutralized to pH 6.0. (C) Supernatants neutralized to pH 6.0 and treated with catalase. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments, according to Cochran's Q test.

2.3. Profile of Organic Acids Produced by the Tested *Lactobacillus* Strains

Lactobacillus spp. produce a variety of organic acids with antimicrobial properties. In our study, lactic, citric, succinic, acetic, propionic, and butyric acids were selected for determination of their presence. Qualitative analyses showed that all of the tested *Lactobacillus* strains produced lactic and succinic acids. Moreover, in the case of *L. crispatus* 13.2, *L. crispatus* 40, and the reference strain *L. gasseri*, the presence of citric acid was detected (Figure 3). Quantitative analyses exhibited the concentrations of these organic acids shown in Table 3. The organic acids produced by *Lactobacillus* strains were mainly lactic and succinic acids. The highest concentration of lactic acid was observed in *L. crispatus* 1.2 (25.09 mM) and *L. saerimneri* 3.2 (21.46 mM). The highest amount of citric acid was produced by *L. crispatus* 40, and *L. jensenii* 22.2 was characterized by the highest concentration of succinic acid (52.11 mM).

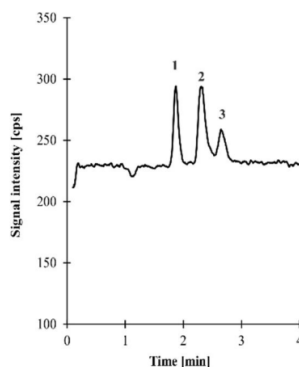


Figure 3. A representative total ion chromatogram of sample 13.2 prepared according to the procedure described in Section 4.5. Chromatographic conditions were as described in Section 4.5. Peaks: 1-lactic acid, 2-citric acid, 3-succinic acid (for assay details, see Supplementary Materials).

Table 3. The concentration (mM) of organic acids: lactic, citric, and succinic acids in cell-free supernatants of *Lactobacillus* strains. The results are presented as the means of three experiments.

<i>Lactobacillus</i> Strains.	Lactic Acid	Citric Acid	Succinic Acid
Concentration (mM)			
<i>L. crispatus</i> 1.2	25.09	-	11.21
<i>L. saerimneri</i> 3.2	21.46	-	4.91
<i>L. crispatus</i> 4	19.24	-	36.51
<i>L. crispatus</i> 6.2	19.24	-	17.12
<i>L. crispatus</i> 13.2	17.87	6.37	4.4
<i>L. jensenii</i> 22.2	13.32	-	52.11
<i>L. gasseri</i> 35.3	10.28	-	0.91
<i>L. crispatus</i> 40	12.49	14.12	1.81
<i>L. crispatus</i> 41.4	16.06	-	8.51
<i>L. crispatus</i> ATCC 33197	9.58	-	4.71
<i>L. gasseri</i> ATCC 33323	7.59	11.52	4.61

2.4. The Effect of Selected Organic Acids on *P. mirabilis* Cells

The effect of selected concentrations of lactic, citric, and succinic acids produced by tested *Lactobacillus* strains on growth inhibition and biofilm formation by *P. mirabilis* strains was tested. The concentrations were selected on the basis of quantitative HPLC results and spectrophotometric methods. A decrease in *P. mirabilis* growth and biofilm formation was observed in samples with the highest concentrations of organic acid solutions. As shown in Figure 4, lactic acid from a concentration of 15 mM inhibited the growth of all *P. mirabilis* strains (except *P. mirabilis* KP). At this concentration, lactic acid was also found to inhibit the biofilm formation of most of the strains tested. Only K0, KP, and K5/MC1 *P. mirabilis* strains showed a greater tolerance range to the action of lactic acid, and, in these cases, the inhibition of biofilm formation was observed at a concentration of 20 mM. Citric acid was distinguished as a highly effective agent in inhibiting the growth of the tested uropathogens. Its concentration of 10 mM significantly inhibited the biofilm formation of all strains except K0 and KP. Succinic acid also showed an antibacterial effect against *P. mirabilis*. The most effective concentration was 50 mM, which significantly inhibited the growth and biofilm formation of all pathogenic strains. These results indicate that citric acid was the most effective against *P. mirabilis* strains.

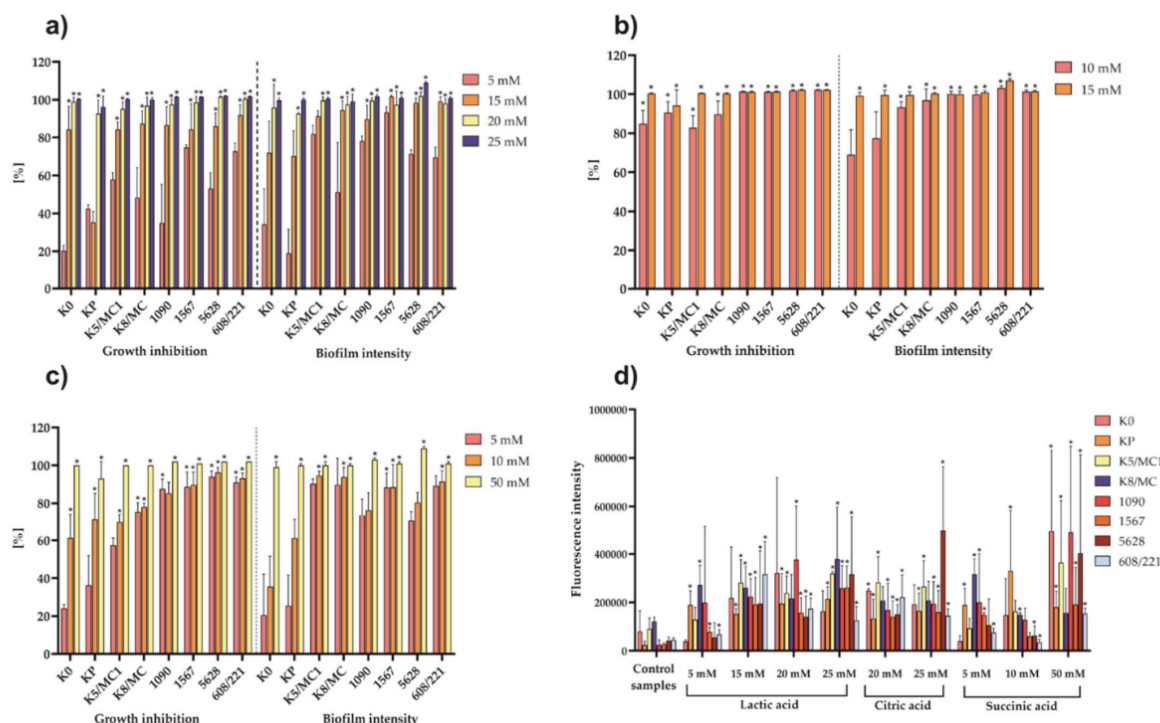


Figure 4. The percentage of *P. mirabilis* strain growth and biofilm formation inhibition by lactic acid (a), citric acid (b), and succinic acid (c). The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments. * $p < 0.05$ for comparison of bacterial growth in the presence of tested organic acids vs. *P. mirabilis* culture without organic acids, according to Cochran's Q test. (d) The fluorescence intensity of *P. mirabilis* in the control culture (without acids) vs. that in the culture incubated with different concentration of organic acids. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of four experiments. * $p < 0.05$ for comparison of fluorescence intensity of *P. mirabilis* treated with acids vs. pure *P. mirabilis* culture, according to U Mann–Whitney test.

One of the proposed mechanisms of the combatant action of organic acids on microorganisms is their ability to cross the cell membrane, which in most cases leads to bacterial cell death. To evaluate the condition of the *P. mirabilis* cell membrane in the presence of tested organic acids, an experiment with propidium iodide, which passes through the damaged cell membrane and binds to DNA, was performed. The U Mann–Whitney test showed significant differences between the fluorescence intensity in the control samples (untreated *P. mirabilis* cells) and samples incubated with acids (Figure 4). In most cases, the observed effect increased along with the increasing lactic, citric, and succinic acids concentrations. However, lactic acid caused significant damage to the *P. mirabilis* cell membrane from a concentration of 15 mM, while citric acid showed this effect from 10 mM, and, in the case of succinic acid, a significant change in fluorescence intensity was observed at 50 mM.

The above results indicate that the mechanisms of action of tested organic acids, which exhibited a strong antibacterial effect, involve penetrating the membrane of the pathogen and disrupting the cell function.

3. Discussion

The present study reports on the antibacterial effects of cell-free supernatants from *Lactobacillus* strains (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, and *L. saerimneri*) isolated from human urine. The focus was on the characteristics of the antimicrobial effect of substances secreted

by *Lactobacillus* on clinical strains of *P. mirabilis* with the indication of the factor with the highest activity. On the basis of many studies, we expected that natural microbiota of the urinary tract which include *Lactobacillus* strains would positively affect the condition of the urinary system and have an inhibitory effect on the development of *P. mirabilis* infections [21–23]. Dysbiosis of the natural microbiota of the urinary tract is related to the development of infections. Under normal conditions, the genitourinary microbiota plays a protective role against urinary tract infections [24]. Lewis et al. [25] showed that women with low levels of *Lactobacillus* are more commonly colonized with pathogens than those with diverse microbiota, which naturally decreases the risk of UTI development. However, changes in the natural microbiota of the urogenital system can be caused by many factors and are associated with age [26], medical treatment [7], diet, or diabetes [27]. Although there are many scientific reports on the antibacterial properties of *Lactobacillus* against pathogens, these data mainly concern strains isolated from the genital tract or food [8,28,29]. The innovativeness of these studies is based on the understanding of the interactions between microorganisms constantly present in the urinary tract and uropathogens.

Our work focused on the evaluation of the antimicrobial effects of *Lactobacillus* agents against *P. mirabilis* due to the fact that this pathogen causes 1–10% of all urinary tract infections, the treatment of which is difficult and requires antibiotic therapy. Treatment for acute uncomplicated cystitis caused by *P. mirabilis* involves a 3 day course of double-strength trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT). Alternative antibiotic therapies include the use of fluoroquinolone, nitrofurantoin, or fosfomycin [30]. However, *Proteus* spp. have developed resistance to several classes of antibiotics, which was also confirmed by our results (Table 1). A high percentage of the isolates were found to be resistant to ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefotaxime, gentamicin, and nitrofurantoin. In the literature data, there are many reports about bacterial resistance to SXT, β -lactams, fluoroquinolones, nitrofurantoin, fosfomycin, aminoglycosides, tetracyclines, and sulfonamides [30–33]. Due to this phenomenon, there is a need to explore other effective and alternative drugs for the treatment of UTIs and their complications.

The tested *Lactobacillus* strains isolated from the urine of healthy people and two reference strains showed antibacterial properties against *P. mirabilis* with varying degrees of intensity. Many researchers also focused on this aspect of research involving *Proteus* spp. Shaaban et al. [34] reported the antimicrobial, anti-adherence, and anti-biofilm activities of two probiotic *L. casei* and *L. reuteri* strains against multidrug-resistant *P. mirabilis* strains. In the course of our research, we showed that various compounds secreted extracellularly were responsible for these properties. Nevertheless, organic acids showed the highest percentage inhibition of *P. mirabilis* growth, which was confirmed by the well diffusion assay and broth microdilution method. A similar effect of organic acids was observed in the case of *Lactobacillus* supernatants against various pathogens such as *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. coli*, *E. faecalis*, *C. difficile*, and *A. acidoterrestris* [35–37]. In this study, we identified the organic acids which played a key role in bacterial growth inhibition. Three common organic acids (lactic acid, citric acid, and succinic acid) were detected. There are many papers about the antimicrobial activity of organic acids secreted by *Lactobacillus*, but they mostly concern the species of *L. plantarum* and species isolated from food [15,38] or their area of interest is mainly lactic acid [39,40]. Hence, determining the concentrations of other acids exhibiting antibacterial properties, secreted by microorganisms of the urinary tract, constitutes a significant supplement to the current knowledge. It is worth mentioning that there is scientific evidence for the antibacterial effect of citric, mandelic, malic, propionic, lactic, hippuric, benzoic, and pyruvic acids against *P. mirabilis* and other pathogens [41].

Urinary tract infections are also associated with biofilm formation by *P. mirabilis*. As many as 48% of the isolated *Proteus* species have the ability to form a biofilm [42]. The formation of a bacterial biofilm is particularly dangerous because it promotes the growth of microorganisms resistant to antibiotics and many other factors, leading to the progression of infections and development of chronic diseases. It is also responsible for blocking urinary catheters by crystalline deposits [34,43]. It has been proven that *Lactobacillus*

cell-free supernatants have excellent inhibitory abilities against the growth and biofilm formation of various bacteria species [44,45]. Ray Mohapatra et al. [46] reported that *L. plantarum* bacteriocin exhibited a broad-spectrum activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and had an ability to inhibit the formation of catheter-associated biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. However, our work was concerned with the effect of the organic acids secreted by *Lactobacillus* strains and their action on *P. mirabilis* biofilm and growth. Acid concentrations were selected on the basis of their determination by HPLC and spectrophotometric methods in *Lactobacillus* cell-free supernatants. These strains differed from each other in terms of the proportions of secreted organic acids, which had an impact on their antimicrobial capacity. Over the course of the experiments, we found that organic acids in different concentrations significantly reduced the bacterial growth and biofilm formation (Figure 4). It turned out that citric acid was highly effective, and lactic acid at a concentration of 20–25 mM exhibited up to 100% effectiveness. Burns et al. [41] examined the antibacterial effect of some organic acids including citric and lactic acids against *P. mirabilis* growth and biofilm formation. Similarly to our results, a higher concentration of organic acids led to a greater effectiveness of growth inhibition and biofilm formation. In their work citric acid significantly inhibited the formation of *P. mirabilis* biofilm at a concentration of 7.8 mM, which is a result similar to our observations. In our study, we also proved that the inhibition of *P. mirabilis* growth and biofilm formation depended on the molar concentration of organic acids, and we demonstrated the potential of organic acids to inhibit biofilm formation on various surfaces, e.g., on catheters.

Undissociated forms of organic acids easily penetrate the lipid membrane of the bacterial cell, before dissociating into anions and protons. Protons of these organic acids lead to cytoplasmic acidification and disruption of certain cell functions. On the other hand, accumulation of anions also results in disruption of metabolic functions, increased osmotic pressure, and cell death [47]. Due to this fact, we assessed *P. mirabilis* viability as a function of the membrane permeability. The results confirmed our assumptions that the tested organic acids disrupted the membrane permeability. Alakomi et al. [48] reported that an increase in the permeability of membranes caused by organic acids enhances the activity of other antimicrobial metabolites. This suggests that the action of organic acids as inhibitors of microbial growth is complex, and other antibacterial agents can be also involved in this process.

In this study, we showed that CFSs derived from *Lactobacillus* isolated from urine exhibited an ability to suppress the growth of *P. mirabilis* bacteria. Interestingly, organic acids were found to be the main factors that displayed these activities. However, further studies are required, concerning their interactions and the influence of other factors such as bacteriocins or hydrogen peroxide on this activity. This study focused on organic acids because they showed the most intensive antimicrobial properties against tested uropathogens. It was revealed that organic acids secreted by *Lactobacillus* have potential in UTI prevention and treatment. These extracellular substances can also have an influence on diseases associated with urinary tract infections such as the development of infectious urinary stones.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains

Lactobacillus strains were obtained from the urinary tract of healthy people. With the consent of the Committee for Bioethics of Scientific Research of the University of Lodz (4/I/2020), sterile urine was collected from volunteers, both men and women, who had not been treated with antibiotics and probiotics in the last 3 months. The samples of urine were centrifuged ($1400 \times g$ for 10 min), the sediments were then seeded on APT agar (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) and incubated in microaerophilic conditions in 5% CO₂ at 37 °C for 48 h. Bacteria were isolated and identified from selected colonies. Species confirmation was performed by observing their morphology. Gram-positive and catalase-negative rods were selected for analysis by mass spectrometry MALDI/TOF Microflex LT

(Bruker, Billerica, MA, USA). Nine of the 43 isolates were identified as *Lactobacillus* species: *L. crispatus* (n = 6), and one representative each of *L. jensenii*, *L. gasseri*, and *L. saerimneri*. In addition, reference strains were included in the research: *L. gasseri* ATCC 33323 and *L. crispatus* ATCC 33197.

Proteus mirabilis strains were isolated from the urine of individuals with diagnosed infectious urolithiasis (1567; 1090; KP; 5628) by the Department of Microbiology of Children's Memorial Health Institute in Warsaw, Poland. The other four *P. mirabilis* strains were collected from urinary stones (608/221; K5/MC1; K8/MC; K0) by Provincial Specialist Hospital M. Pirogow in Lodz. The strains were identified using the API 20E test (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) and were cultured on TSB (tryptic soy broth, BTL, Warsaw, Poland) for 24 h at 37 °C. The susceptibility of these strains to the most common antibiotics used in urinary tract infections treatment was investigated using the method recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The list of antibiotics used in this assay is provided in Table 1. The diameters of inhibition zones were measured and compared with the EUCAST breakpoints [49]. The results were expressed as the percentage resistance, where 100% was the number of all tested *P. mirabilis* strains (n = 8). All of the isolates were stored at −80 °C as frozen stocks in the presence of DMSO.

4.2. *Lactobacillus* Cell-Free Supernatant (CFS) Preparation

Lactobacillus strains were cultured in APT broth at 37 °C for 48 h in 5% CO₂. Subsequently, the cultures were centrifuged (3300× g, 4 °C, 30 min) and the supernatants were treated by several factors described in well diffusion and broth microdilution assays to evaluate which substances secreted by *Lactobacillus* showed antibacterial properties against tested uropathogens. Obtained supernatants were sterilized by filtration through a sterile syringe filter Minisart (0.22 µm pore size filter, Sartorius, Goettingen, Germany).

4.3. Well Diffusion Assay

The agar well diffusion method was used to detect antimicrobial activities of *Lactobacillus* CFSs. These properties were estimated according to the Prabhurajeshwar et al. [50] method with some modifications. The supernatants without the bacteria were separated into two aliquots with the first one left untreated. The second sample was neutralized to pH 6.0 by 1 M NaOH to exclude the impact of organic acids secreted by *Lactobacillus*. *P. mirabilis* strains were cultured on TSB medium for 24 h at 37 °C; afterward, 100 µL of the culture was swabbed on the surface of MH agar plates (Mueller Hinton, Biomaxima, Lublin, Poland). Next, 100 µL of CFS of lactobacilli and 100 µL of APT broth as a negative control were transferred to 7 mm diameter wells. After 24 h of incubation at 37 °C, inhibition zones were measured.

4.4. Broth Microdilution Method

The influence of different substances secreted by *Lactobacillus* was estimated according to Chen et al.'s method [51] with some modifications. The cell-free supernatants (CFSs) of *Lactobacillus* species were separated into four aliquots and used in the broth microdilution method to check the activity of different substances secreted by *Lactobacillus* on *P. mirabilis* growth. The first one was untreated, the second one was neutralized to pH 6.0 by 1 M NaOH to determine the antagonistic effect dependent on organic acids, and the third one was additionally treated with catalase (5 µg/mL, 1 h at 37 °C, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France), to determine if any antibacterial property was due to the presence of hydrogen peroxide. The fourth aliquot was also neutralized to pH 6.0 and heated (70 °C/30 min), which excluded the action of thermolabile proteins such as bacteriocins. Then, 100 µL of *P. mirabilis* suspension in TSB (10⁶ CFU/mL) was added to 96-well plates with 100 µL of CFS of each *Lactobacillus*. The negative control was 100 µL of TSB medium mixed with 100 µL of APT medium. The positive control was 100 µL of bacterial suspension mixed with 100 µL of APT medium. After 24 h at 37 °C of incubation, the inhibition of bacterial growth was detected by measuring turbidity at 600 nm using a microplate reader Multiskan Ex

(Labsystems, Helsinki, Finland). The results were expressed as a percentage of *P. mirabilis* growth inhibition, where absorbance equal to the positive control denoted no inhibition and 100% inhibition was the absorbance of the negative control.

4.5. Analysis of the Profile of Organic Acids Produced by *Lactobacillus*

Samples (untreated CFSs, obtained according to the method described in Section 4.2) were diluted 100,000 times with LC–MS-grade water, filtered through 0.45 µm nylon membrane, and then injected (5 µL) into the 1260 Infinity II LC system coupled with the triple-quadrupole G6470B mass spectrometer system (MS/MS) with Agilent JetStream ionization technology (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Analytes were separated on the Reprospher 100 C-18 Aqua (100 × 2.0 mm; 1.8 µm) column obtained from Dr. Maisch, High-Performance LC GmbH (Entringen, Germany). The chromatographic separation of the analytes was accomplished at room temperature (25 °C), using gradient elution with the mobile phase consisting of (A) water and methanol (95:5; v/v) and (B) methanol and water (95:5; v/v), both with 0.1% formic acid, delivered at a flow rate of 0.2 mL/min. The analytes were monitored by MS/MS operated in negative electrospray ionization (ESI) mode. Identification and confirmation of the target compounds in real samples were based upon a comparison of retention time and ESI MS spectra with a corresponding set of data obtained by analyzing authentic compounds. A single standard addition method was used to establish levels of citric acid and succinic acid in the study samples (for assay details, see Supplementary Materials).

To determine the concentration of lactic acid in CFSs of *Lactobacillus*, the spectrophotometric method was performed according to Borshchevskaya et al.'s method [52] with some modifications. Briefly, 5 µL of *Lactobacillus* cell-free supernatant was added to 200 µL of a 0.2% solution of iron(III) chloride. The absorbance was measured at 390 nm using a microplate reader Multiskan Ex against the reference solution (200 µL of a 0.2% FeCl₃ solution). The concentration of lactic acid was expressed in millimoles.

4.6. Determination of the Effects of Organic Acids on *P. mirabilis* Growth Inhibition and Biofilm Formation

The evaluation of the antimicrobial activity of organic acids was performed using the broth microdilution method, with some modifications. First, 100 µL of *P. mirabilis* suspension in TSB (10⁶ CFU/mL) was added to 96-well plates with 100 µL of the three tested organic acids (lactic acid, citric acid, and succinic acid) at different concentrations, as shown in Figure 4. The negative control was 100 µL of TSB medium with 100 µL of organic acids. The positive control was 100 µL of bacterial suspension. After 24 h of incubation at 37 °C, the inhibition of bacterial growth was detected by measuring turbidity at 550 nm using a microplate reader Multiskan Ex. The results were expressed as of the percentage *P. mirabilis* growth inhibition. A biofilm assay was performed on the same plates according to Maszewska et al.'s method [53]. After 24 h of incubation, the biofilms of *P. mirabilis* were washed with 0.85% NaCl to remove unbound cells. To determine the cell viability, the biofilms were treated with 50 µL of MTT (5 mg/mL in PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) and 200 µL of TSB medium. The plate was incubated for 30 min at 37 °C, and then 300 µL of DMSO (dimethyl sulfoxide) and 50 µL of glycine buffer were added to dissolve formazan crystals. Absorbance was measured at 550 nm. The inhibition percentage was calculated by the difference in growth in the absence and presence of organic acids.

4.7. The Impact of Organic Acids on *P. mirabilis* Membrane Integrity

In order to explain the mechanism of action of organic acids and their impact on *P. mirabilis* membrane permeability, the assay with propidium iodide was carried out [54]. First, 500 µL of *P. mirabilis* suspension in TSB (10⁶ CFU/mL) was incubated for 24 h at 37 °C with 500 µL of the appropriate organic acid concentration. The negative control was *P. mirabilis* suspension. After incubation, the samples were centrifuged for 10 min at 14,000 × g. The obtained sediments were suspended in 1 mL of PBS (phosphate-buffered

saline) and centrifuged under the same conditions. Next, the previous step of the procedure was repeated, and 2 μL of propidium iodide (1 mg/mL^{-1} in H_2O , Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was added; the samples were incubated for 5 min at room temperature in the dark. The residual dye was removed by centrifugation in the above-described conditions and washed once in PBS. Final precipitates were suspended in 200 μL of PBS. The fluorescence intensity was measured using a Spectramax i3 Molecular Devices spectrofluorometer (Syngen Biotech, Wroclaw, Poland) with the following parameters: $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$. In addition, the cell density of tested samples was measured at 550 nm using a microplate reader Multiskan Ex, and the fluorescence activity was calculated by dividing the fluorescence results by OD550.

4.8. Statistical Analysis

All experiments were carried out at least in triplicate. Statistical analyses were based on t-Student test with the Cochran-Cox adjustment (Cochran's Q test) and the Mann-Whitney U test performed using Statistica software version 13.3 pl (StatSoft, Krakow, Poland). The results were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

5. Conclusions

The microbiota of the urinary tract is still a poorly understood microbiological environment. In this paper, we showed that *Lactobacillus* spp. isolated from urine possess high antibacterial efficacy by inhibiting the growth of the common pathogen *P. mirabilis*, which causes urinary tract infections. This antimicrobial and antibiofilm capacity was mainly attributed to organic acids (lactic, citric, and succinic) secreted by *Lactobacillus*. The obtained results may constitute an important step in understanding the interactions between pathogens and natural microbiota of the urinary tract. Additionally, *Lactobacillus* microorganisms or the organic acids secreted by them could contribute to the prevention or may support the treatment of UTIs in the future. An interesting aspect for further study may be the influence of the natural microbiota of urine and its extracellular substances on UTI complications such as the formation of infectious urinary stones or CAUTIs.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27175557/s1>, File S1: LC-MS/MS analysis of the profile of organic acids produced by *Lactobacillus*.

Author Contributions: Conceptualization, A.T. and D.S.; methodology, D.S., J.P. and R.G.; investigation, D.S. and J.P.; writing—original draft preparation, D.S. and J.P.; writing—review and editing, A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Committee for Bioethics of Scientific Research of the University of Lodz (4/I/2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education, Poland (core funding for statutory research activity, Department of Biology of Bacteria, University of Lodz).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not applicable.

References

- Martinez, R.M.; Hulten, K.G.; Bui, U.; Clarridge, J.E. Molecular Analysis and Clinical Significance of *Lactobacillus* spp. Recovered from Clinical Specimens Presumptively Associated with Disease. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 30–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Abdelmaksoud, A.A.; Koparde, V.N.; Sheth, N.U.; Serrano, M.G.; Glascock, A.L.; Fettweis, J.M.; Strauss, J.F.; Buck, G.A.; Jefferson, K.K. Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology*. **2016**, *162*, 466–475. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Petrova, M.I.; Lievens, E.; Mail, S.; Imholz, N.; Lebeer, S. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wolfe, A.J.; Brubaker, L. Urobiome Updated: Advances in Urinary Microbiome Research. *Nat. Rev. Urol.* **2019**, *16*, 73–74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Thomas-White, K.; Forster, S.C.; Kumar, N.; Van Kuiken, M.; Putonti, C.; Stares, M.D.; Hilt, E.E.; Price, T.K.; Wolfe, A.J.; Lawley, T.D. Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1557. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Aragón, I.M.; Herrera-Imbroda, B.; Queipo-Ortuño, M.I.; Castillo, E.; Del Moral, J.S.; Gómez-Millán, J.; Yucel, G.; Lara, M.F. The urinary tract microbiome in health and disease. *Eur. Urol. Focus.* **2018**, *4*, 128–138. [\[CrossRef\]](#)
- Gottschick, C.; Deng, Z.L.; Vital, M.; Masur, C.; Abels, C.; Pieper, D.H.; Wagner-Döbler, I. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. **2017**, *5*, 99. [\[CrossRef\]](#)
- Torzewska, A.; Wiewiura, P.; Brodecka, D.; Szczerbiec, D.; Różalski, A. Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains Derived from Food Intensify Crystallization Caused by *Proteus mirabilis* in Urine. *Probiotics. Antimicrob. Proteins*. **2021**, *13*, 441–452. [\[CrossRef\]](#)
- Shim, Y.H.; Lee, S.J.; Lee, J.W. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains against uropathogens. *Pediatr. Int.* **2016**, *58*, 1009–1013. [\[CrossRef\]](#)
- Oliveira, L.C.; Silveira, A.M.M.; Monteiro, A.S.; Dos Santos, V.L.; Nicoli, J.R.; Azevedo, V.A.C.; Soares, S.C.; Dias-Souza, M.V.; Nardi, R.M.D. In silico Prediction, in vitro Antibacterial Spectrum and Physicochemical Properties of a Putative Bacteriocin Produced by *Lactobacillus rhamnosus* Strain L156.4. *Front. Microbiol.* **2017**, *19*, 876. [\[CrossRef\]](#)
- Todorov, S.D.; Perin, L.M.; Carneiro, B.M.; Rahal, P.; Holzapfel, W.; Nero, L.A. Safety of *Lactobacillus plantarum* ST8Sh and Its Bacteriocin. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. **2017**, *9*, 334–344. [\[CrossRef\]](#)
- Jiang, Y.H.; Xin, W.G.; Yang, L.Y.; Ying, J.P.; Zhao, Z.S.; Lin, L.B.; Li, X.Z.; Zhang, Q.L. A novel bacteriocin against *Staphylococcus aureus* from *Lactobacillus paracasei* isolated from Yunnan traditional fermented yogurt: Purification, antibacterial characterization, and antibiofilm activity. *J. Dairy. Sci.* **2022**, *105*, 2094–2107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhang, X.; Smail, G.A.; Alzeer, A.F.; Arasu, M.V.; Vijayaraghavan, P.; Choi, K.C.; Al-Dhabi, N.A. Probiotic characteristic of *Lactobacillus* strains isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens. *Saudi J. Biol. Sci.* **2022**, *27*, 3505–3513. [\[CrossRef\]](#)
- Martin, R.; Suarez, J.E. Biosynthesis and Degradation of H₂O₂ by Vaginal *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 400–405. [\[CrossRef\]](#)
- Hu, C.H.; Ren, L.Q.; Zhou, Y.; Ye, B.C. Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 1997–2005. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Khalil, E.S.; Abd Manap, M.Y.; Mustafa, S.; Alhelli, A.M.; Shokryazdan, P. Probiotic Properties of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus* Strains Isolated from Tempoyak. *Molecules*. **2018**, *23*, 398. [\[CrossRef\]](#)
- Armbruster, C.E.; Mobley, H.L.T.; Pearson, M.M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal. Plus.* **2018**, *8*, 10. [\[CrossRef\]](#)
- Yuan, F.; Huang, Z.; Wang, G.; Li, P.; Yang, B.; Li, J. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Urol. Int.* **2021**, *105*, 354–361. [\[CrossRef\]](#)
- Jones, S.M.; Yerly, J.; Hu, Y.; Ceri, H.; Martinuzzi, R. Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. *FEMS. Microbiol. Lett.* **2007**, *268*, 16–21. [\[CrossRef\]](#)
- Klein, R.D.; Hultgren, S.J. Urinary tract infections: Microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 211–226. [\[CrossRef\]](#)
- Shokouhfar, M.; Kermanshahi, R.K.; Feizabadi, M.M.; Teimourian, S.; Safari, F. *Lactobacillus* spp. derived biosurfactants effect on expression of genes involved in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Infect. Genet. Evol.* **2022**, *100*, 105264. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jayalath, S.; Magana-Arachchi, D. Dysbiosis of the Human Urinary Microbiome and its Association to Diseases Affecting the Urinary System. *Indian J. Microbiol.* **2022**, *62*, 153–166. [\[CrossRef\]](#)
- Lee, H.Y.; Wang, J.W.; Juan, Y.S.; Li, C.C.; Liu, C.J.; Cho, S.Y.; Yeh, H.C.; Chueh, K.S.; Wu, W.J.; Wu, D.C. The impact of urine microbiota in patients with lower urinary tract symptoms. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2021**, *20*, 23. [\[CrossRef\]](#)
- Kawalec, A.; Zwolińska, D. Emerging Role of Microbiome in the Prevention of Urinary Tract Infections in Children. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 870. [\[CrossRef\]](#)
- Lewis, A.L.; Gilbert, N.M. Roles of the vaginal microbiota in urinary tract infection: Evidence from clinical correlations and experimental models. *GMS Infect. Dis.* **2020**, *8*, Doc02.
- Perez-Carrasco, V.; Soriano-Lerma, A.; Soriano, M.; Gutiérrez-Fernández, J.; García-Salcedo, J.A. Urinary microbiome: Yin and Yang of the Urinary Tract. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 617002. [\[CrossRef\]](#)
- Hrbacek, J.; Tlaskal, V.; Cermak, P.; Hanacek, V.; Zachoval, R. Bladder Microbiota Are Associated with Clinical Conditions That Extend beyond the Urinary Tract. *Microorganisms* **2022**, *10*, 874. [\[CrossRef\]](#)

28. Argentini, C.; Fontana, F.; Alessandri, G.; Lugli, G.A.; Mancabelli, L.; Ossiprandi, M.C.; van Sinderen, D.; Ventura, M.; Milani, C.; Turroni, F. Evaluation of Modulatory Activities of *Lactobacillus crispatus* Strains in the Context of the Vaginal Microbiota. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *27*, e0273321. [CrossRef]
29. Bungenstock, L.; Abdulmawjood, A.; Reich, F. Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0230345. [CrossRef]
30. Schaffer, J.N.; Pearson, M.M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol. Spectr.* **2015**, *3*, UTI-0017-2013. [CrossRef]
31. Filipiak, A.; Chrapek, M.; Literacka, E.; Wawszczak, M.; Głuszek, S.; Majchrzak, M.; Wróbel, G.; Łysek-Gładyńska, M.; Gniadkowski, M.; Adamus-Bialek, W. Pathogenic Factors Correlate with Antimicrobial Resistance among Clinical *Proteus mirabilis* Strains. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 579389. [CrossRef] [PubMed]
32. Mokracka, J.; Gruszczyńska, B.; Kaznowski, A. Integrins, β -lactamase and *qnr* genes in multidrug resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*. *APMIS* **2012**, *120*, 950–958. [CrossRef] [PubMed]
33. Mirzaei, A.; Habibi, M.; Bouzari, S.; Asadi Karam, M.R. Characterization of Antibiotic-Susceptibility Patterns, Virulence Factor Profiles and Clonal Relatedness in *Proteus mirabilis* Isolates from Patients with Urinary Tract Infection in Iran. *Infect. Drug. Resist.* **2019**, *12*, 3967–3979. [CrossRef] [PubMed]
34. Shaaban, M.; Abd El-Rahman, O.A.; Al-Qaidi, B.; Ashour, H.M. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Probiotic *Lactobacilli* on Antibiotic-Resistant *Proteus mirabilis*. *Microorganisms* **2020**, *8*, 960. [CrossRef]
35. Koohestani, M.; Moradi, M.; Tajik, H.; Badali, A. Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Res. Forum.* **2018**, *9*, 301–306.
36. Tejero-Sarinena, S.; Barlow, J.; Costabile, A.; Gibson, G.R.; Rowland, I. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe* **2012**, *18*, 530–538. [CrossRef]
37. Ju, H.; Chen, H.; Xiang, A.; Wang, Y.; Yue, T.; Yuan, Y. Identification and characterization of *Lactobacillus paracasei* strain MRS-4 antibacterial activity against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *LWT* **2021**, *150*, 111991. [CrossRef]
38. Bukhari, S.A.; Salman, M.; Numan, M.; Javed, M.R.; Zubair, M.; Mustafa, G. Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 1871–1881. [CrossRef]
39. Neal-McKinney, J.M.; Lu, X.; Duong, T.; Larson, C.L.; Call, D.R.; Shah, D.H.; Konkel, M.E. Production of organic acids by probiotic *lactobacilli* can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43928.
40. Gezgin, Y.; Topcal, F.; Comertpay, S.; Akyol, I. Quantitative analysis of the lactic acid and acetaldehyde produced by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* strains isolated from traditional Turkish yogurts using HPLC. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 1426–1434. [CrossRef]
41. Burns, J.; McCoy, C.P.; Irwin, N.J. Synergistic activity of weak organic acids against uropathogens. *J. Hosp. Infect.* **2021**, *111*, 78–88. [PubMed]
42. Kwiecińska-Piróg, J.; Skowron, K.; Zniszczol, K.; Gospodarek, E. The assessment of *Proteus mirabilis* susceptibility to ceftazidime and ciprofloxacin and the impact of these antibiotics at subinhibitory concentrations on *Proteus mirabilis* biofilms. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 930876. [PubMed]
43. Srivastava, D.; Srivastava, S.; Singh, P.C.; Kumar, A. Mechanisms of Biofilm Development, Antibiotic Resistance and Tolerance and Their Role in Persistent Infections. In *Antibacterial Drug Discovery to Combat MDR*; Ahmad, I., Ahmad, S., Rumbaugh, K., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 115–130.
44. Yang, K.M.; Kim, J.S.; Kim, H.S.; Kim, Y.Y.; Oh, J.K.; Jung, H.W.; Park, D.S.; Bae, K.H. *Lactobacillus reuteri* AN417 cell-free culture supernatant as a novel antibacterial agent targeting oral pathogenic bacteria. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1631.
45. Rossoni, R.D.; Velloso, M.D.S.; de Barros, P.P.; de Alvarenga, J.A.; Santos, J.D.D.; Santos Prado, A.C.C.D.; Ribeiro, F.C.; Anbinder, A.L.; Junqueira, J.C. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microb. Pathog.* **2018**, *123*, 361–367. [PubMed]
46. Ray Mohapatra, A.; Jeevaratnam, K. Inhibiting bacterial colonization on catheters: Antibacterial and antibiofilm activities of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* SJ33. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, *19*, 85–92. [PubMed]
47. Peh, E.; Kittler, S.; Reich, F.; Kehrenberg, C. Antimicrobial activity of organic acids against *Campylobacter* spp. and development of combinations- A synergistic effect? *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0239312.
48. Alakomi, H.L.; Skytta, E.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Latva-Kala, K.; Helander, I.M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *66*, 2001–2005.
49. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 11.0, 2021. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf (accessed on 19 April 2022).
50. Prabhurajeshwar, C.; Chandrakanth, K. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clin. Nutr.* **2018**, *23*, 97–115. [CrossRef]
51. Chen, C.C.; Lai, C.C.; Huang, H.L.; Huang, W.Y.; Toh, H.S.; Weng, T.C.; Chuang, Y.C.; Lu, Y.C.; Tang, H.J. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 789.
52. Borshchevskaya, L.N.; Gordeeva, T.L.; Kalinina, A.N.; Sineokii, S.P. Spectrophotometric Determination of Lactic Acid. *J. Anal. Chem.* **2016**, *71*, 755–758. [CrossRef]

-
53. Maszewska, A.; Moryl, M.; Wu, J.; Liu, B.; Feng, L.; Rozalski, A. Amikacin and bacteriophage treatment modulates outer membrane proteins composition in *Proteus mirabilis* biofilm. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1522. [[PubMed](#)]
 54. Stolarek, P.; Różalska, S.; Bernat, P. Lipidomic adaptations of the *Metarhizium robertsii* strain in response to the presence of butyltin compounds. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **2019**, *1861*, 316–326. [[PubMed](#)]

Organic Acids Secreted by *Lactobacillus* spp. Isolated from Urine and Their Antimicrobial Activity against Uropathogenic *Proteus mirabilis*

LC–MS/MS Analysis of the Profile of Organic Acids Produced by *Lactobacillus*

1. Reagents and Materials

All chemicals used throughout this study were commercially available and at least of analytical reagent grade. Acetic acid, propionic acid, butyric acid, lactic acid, succinic acid, and citric acid were from Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). (In)organic solvents and mobile-phase additives suitable for liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC–MS), namely, water, methanol, acetonitrile, and formic acid, were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Samples were filtered prior to chromatographic analysis using the Agilent Captiva filter vials with a 0.45 µm nylon membrane (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

2. Instrumentation

An Agilent 1260 Infinity II LC system equipped with a flexible pump integrated with a vacuum degasser model G7104C, temperature-controlled sample storage combined with automated sample injector model G7129C, column compartment model G7116B, and triple quadrupole G6470B mass spectrometer system (MS/MS) with Agilent JetStream ionization technology (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used for the chromatographic experiments. Data acquisition and analysis were performed using the MassHunter software. Analytes were separated on the Reprospher 100 C-18 Aqua (100 × 2.0 mm; 1.8 µm) column from Dr. Maisch, High-Performance LC GmbH (Entringen, Germany). Samples were stored in an ultralow-temperature freezer (Panasonic Healthcare Co., Ltd., Sakata, Japan). For sample shaking, the Multi Speed Vortex MSV-3500 (Biosan, Latvia) was used.

3. Stock Solutions

The stock solutions of citric acid and succinic acid (0.1 M) were prepared daily by dissolving an appropriate amount of powder in LC–MS-grade water. Then, the solutions were kept at 4 °C for no longer than 24 h. The working solutions of all carboxylic acids (analytes) were prepared freshly by dilution of a particular standard solution with LC–MS-grade water as needed and were processed without delay. Importantly, all solutions were stored in airtight glassy vials at 4 °C.

4. Sample Handling

The obtained samples were stored at –80 °C until analysis. The samples were processed without delay, after defrosting at room temperature, using the procedure described in Section 5.

5. Sample Preparation for Chromatographic Analysis

The samples were diluted 100,000 times with LC–MS-grade water followed by filtration through a 0.45 µm nylon membrane, and then placed in a thermostated autosampler set to 4 °C. Then, 5 µL of the resulting solution was injected into the LC–MS/MS system.

6. Chromatographic Conditions

The chromatographic separation of the analytes was accomplished using the Reprospher 100 C-18 Aqua (100 × 2.0 mm; 1.8 µm) column with the mobile phase consisting of (A) water and methanol (95:5; *v/v*) with 0.1% formic acid and (B) methanol and water (95:5; *v/v*) with 0.1% formic acid, delivered at a flow rate of 0.2 mL/min. The chromatographic separation was performed at room temperature (25 °C) using gradient elution: 0–4 min, 100–80% A; 4–6 min, 80–100% A; 6–12.5 min, 100% A. The MS/MS detector was operated in negative electrospray ionization (ESI) mode with MRM optimization and ion source optimization, including the LC flow-dependent and compound(s)-dependent parameters of ion source optimization, conducted using the MassHunter Optimizer and Ion Source Optimization Source and iFunnel Optimizer.

7. Qualitative Analysis

The identification and confirmation of the target compounds were performed by analyzing the standard solution of carboxylic acid (100 nM) processed according to the procedure described in sections 5 and 6. Initially, the analyses were carried out using the LC–MS/MS system, which was set to acquire data in scan mode. The ESI MS spectra were recorded by setting the instrument to gather data, stepping the mass filter within the *m/z* 30–450 range. In all cases, products with a deprotonated molecular ion $[M - H]^-$ were observed. The confirmation of the origin of the particular peak of the compound of interest in real samples was based upon a comparison of retention time and specific ESI MS spectra with a corresponding set of data obtained by analyzing an authentic compound. In order to increase sensitivity and selectivity in the trace analysis, analyses were also conducted with SIM and MRM MS modes to confirm or exclude the presence of a particular carboxylic acid in study samples.

8. Quantitative Analysis

A single standard addition method was used to establish levels of citric acid and succinic acid in the study samples. For this purpose, the analyses were conducted in MRM MS mode. The target compounds were quantified using the precursor to product ion transitions of *m/z* 191.1 → 111.0 and *m/z* 117.1 → 73.2 for citric acid and succinic acid, respectively. The endogenous concentrations of the analyte(s) were evaluated on the basis of the data obtained from triplicate analysis of a particular blank sample from an individual source and the same sample spiked with a known quantity of the analyte(s), providing a concentration in the study sample of 100 nM. The concentration of the analyte(s) in each sample was calculated using the following formula:

$$C_x = \frac{Y_x \times C_s}{Y_s - Y_x},$$

where C_x is the concentration of the analyte in the blank sample, Y_x is the analytical signal for the sample containing only the analyte, C_s is the concentration for the sample with the addition of a known amount of the standard, and Y_s is the analytical signal for the sample with the addition of a known amount of the standard.

III.2. Publikacja 2

Szczerbiec D., Bednarska-Szczepaniak K., Torzewska A. *Antibacterial properties and urease suppression ability of Lactobacillus inhibit the development of infectious urinary stones caused by Proteus mirabilis*. Sci Rep. 2024, 14, 934.

doi: 10.1038/s41598-024-51323-0



OPEN Antibacterial properties and urease suppression ability of *Lactobacillus* inhibit the development of infectious urinary stones caused by *Proteus mirabilis*

Dominika Szczerbic¹, Katarzyna Bednarska-Szczepaniak² & Agnieszka Torzewska¹✉

Infectious urolithiasis is a type of urolithiasis, that is caused by infections of the urinary tract by bacteria producing urease such as *Proteus mirabilis*. *Lactobacillus* spp. have an antagonistic effect against many pathogens by secreting molecules, including organic acids. The aim of the study was to determine the impact of *Lactobacillus* strains isolated from human urine on crystallization of urine components caused by *P. mirabilis* by measuring bacterial viability (CFU/mL), pH, ammonia release, concentration of crystallized salts and by observing crystals by phase contrast microscopy. Moreover, the effect of lactic acid on the activity of urease was examined by the kinetic method and in silico study. In the presence of selected *Lactobacillus* strains, the crystallization process was inhibited. The results indicate that one of the mechanisms of this action was the antibacterial effect of *Lactobacillus*, especially in the presence of *L. gasseri*, where ten times less *P. mirabilis* bacteria was observed, compared to the control. It was also demonstrated that lactic acid inhibited urease activity by a competitive mechanism and had a higher binding affinity to the enzyme than urea. These results demonstrate that *Lactobacillus* and lactic acid have a great impact on the urinary stones development, which in the future may help to support the treatment of this health problem.

Urolithiasis is one of the most common diseases of the urinary system with an incidence of 1–13%, depending on the geographical region. It is reported that the number of cases and deaths from this highly widespread disease is constantly increasing, while the age of people suffering from urolithiasis is decreasing^{1,2}. Many factors may be responsible for this trend, including diet, climate, physical activity or obesity³. In general, based on their chemical composition, urinary stones can be divided into calcium oxalate stones (which are the most common type), calcium phosphate stones, uric acid stones, cystine stones and struvite stones. The last type includes stones, which are formed as a result of the infection in the urinary tract⁴. According to the literature data, infectious stones account for even 15% of all urinary stones^{5–7} and they are caused by the activity of bacterial urease, a nickel-dependent metalloenzyme⁸. Microorganisms responsible for this process belong mainly to the genus *Proteus*. They are isolated from up to 70% of infectious stones⁹ and all of *Proteus* isolates from urinary stones produce urease^{7,10}. Urease catalyzes the hydrolysis of urea into carbon dioxide (CO₂) and ammonia (NH₃), which increases urinary pH. The concentrations of ammonium, bicarbonate and phosphate ions increase, which in the presence of magnesium and calcium ions, leads to the precipitation of carbonate apatite (Ca₁₀(PO₄)₆CO₃) and struvite (MgNH₄PO₄·6H₂O)⁵. Precipitation of mineral components of urine caused by their excessive concentration in relation to the solubility leads to crystallization (struvite and apatite crystals) – the initial stage of urinary stones formation. During the next phase, the struvite and apatite crystals aggregate, which results in the formation of a urinary stone and its retention in the urinary tract¹¹. Treatment of infectious urolithiasis is a long-term and complicated process. It includes antibiotic treatment to eliminate the pathogen, stone removal using shock wave lithotripsy (SWL) or percutaneous nephrolithotomy (PCNL) and recurrence prevention^{10,12}. Antibiotic therapy is often challenging. An antibiotic is not able to penetrate into the stone, where microorganisms can also live, which allows them to survive and leads to the formation of urinary stones de novo¹³. There are several methods

¹Department of Biology of Bacteria, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland. ²Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Medical Biology PAS, Lodowa 106, 92-232 Lodz, Poland. ✉email: agnieszka.torzewska@biol.uni.lodz.pl

of supporting the urolithiasis treatment e.g. use of urease inhibitors or urinary acidification with ascorbic acid, ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium nitrite and L-methionine^{10,12}. Nevertheless, due to the lack of proper methods of prevention and the fact that current treatment does not prevent the recurrences, there is a need to find alternative sources that will act preventively or may support the traditional treatment of the developing disease.

According to many data, *Lactobacillus* belong to the natural microbiota of the urinary tract have a huge impact on this environment and uropathogens^{14–16}. They exert their protective properties through many mechanisms like producing antibacterial compounds (bacteriocins, hydrogen peroxide, organic acids), inhibition of pathogen adhesion or exhibiting immunomodulatory effect. Recently, there have been many indications of the possibility of using lactic acid bacteria for the treatment and prevention of UTI^{17–19}. Many recent in vitro studies also emphasized the use of probiotic strains, including *Lactobacillus*, to treat or prevent the development of calcium oxalate stones^{20,21}. Therefore, it is interesting to know if natural microbiota of the urinary tract has also an influence on one of the UTIs complications i.e. formation of infectious urinary stones.

Our study focused on the interactions between the natural microbiota of the human urinary tract and *Proteus*, one of the genera, most frequently isolated from infectious urinary stones. The present paper was designed to determine the impact of *L. crispatus*, *L. jensenii* and *L. gasseri* isolated from human urine and substances secreted by them on the inhibition of the crystallization process caused by *P. mirabilis* and on urease activity, which plays an important role in the development of infectious urinary stones.

Material and methods

Bacterial strains

P. mirabilis strains (KP; 5628) were isolated at the Department of Microbiology from the urine of patients of the Children's Memorial Health Institute in Warsaw, Poland, who had been diagnosed with infectious urolithiasis. The other two *P. mirabilis* strains (608/221; K8/MC) were obtained from urinary stones and provided by the Provincial Specialist Hospital M. Pirogow in Lodz. The strains were identified using the API 20E test (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France) and cultured on TSB (tryptic soy broth, BTL, Warsaw, Poland) for 24 h at 37 °C.

Lactobacillus strains were isolated from the urinary tract of healthy people, and were deposited in the bacterial strain collection at the Department of Biology of Bacteria, University of Lodz. The method of isolation of these strains and their characteristics had been described in our previous study¹⁴. Briefly, strains were obtained from human urine, of both men and women who had not been treated with antibiotics or probiotics in the last 3 months. Urine samples were obtained from all participants and/or legal guardians with their informed consent and the research were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. All experimental protocols were approved by University of Lodz Research Ethics Committee (approval number 4/(I)/KBBN-UL/II/2020). Strains, were identified by mass spectrometry MALDI/TOF Microflex LT (Bruker, Billerica, MA, USA). *Lactobacillus* spp. were cultured on APT agar (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) and incubated in 5% CO₂ at 37 °C for 48 h.

Synthetic urine

Synthetic urine, the composition of which chemically corresponds to the mean concentrations found in normal human urine during a 24-h period was made as described by Griffith et al.²² with some modifications. It contained the following components [g/L]: CaCl₂ × 2H₂O, 0.651; MgCl₂ × 6H₂O, 0.651; NaCl, 4.6; Na₂SO₄, 2.3; sodium citrate 0.65; sodium oxalate 0.02; KH₂PO₄, 2.8; KCl, 1.6; NH₄Cl, 1.0; urea 25.0; creatinine, 1.1 and tryptic soy broth, 10.0 (Sigma, St. Louis, MO, USA). The solution was prepared immediately before the experiment and sterilized by passing through a 0.2 µm pore-size filter (Sartorius, Goettingen, Germany).

Crystallization experiment in mixed cultures

The crystallization assay was performed according to the Torzewska et al. method²³ with some modifications. To 20 mL of synthetic urine, 20 µL of bacterial cultures were added in the ratio 1:5 of *P. mirabilis* (KP, K8/MC, 5628, 608/221) and *Lactobacillus* (*L. crispatus* 1.2, *L. crispatus* 4, *L. jensenii* 22.2 and *L. gasseri* 35.3) (it was determined that in this ratio, crystallization was most intensively inhibited by *Lactobacillus*, data not shown). *Lactobacillus* and *Proteus* strains were cultured as described in section "Bacterial strains".

At first, the induction time of crystallization i.e., the time between the creation of supersaturation and the appearance of crystals was assessed. The absorbance of the above samples was measured every half hour at a wavelength of 600 nm using a spectrophotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, USA). It allowed selection of crucial hours in which the intensity of crystallization was determined.

At 0, 3, 6, 8 and 24 h, the pH, the number of *P. mirabilis*, the amount of released ammonia, and the intensity of crystallization were assessed. Pure cultures of *P. mirabilis* in synthetic urine were controls in this experiment. Confirmation of the crystallization of struvite and apatite occurring under such experimental conditions was carried out in our previous studies^{24,25}. The intensity of crystallization was assessed on the basis of quantitative and qualitative determinations. Quantitative research included the assessment of the Ca²⁺ and Mg²⁺ ions concentrations by atomic absorption spectroscopy (SpectAA-300 Varian, Palo Alto, California). For these analyses, 1 mL of each sample was collected, centrifuged (8000 rcf, 5 min), and treated for mineralization with 0.5 mL 65% HNO₃. Struvite and apatite crystals were observed using a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TE-2000-S). The pH was determined using a pH meter (Elmetron Cp-215, Zabrze, Poland) and the ammonia release was measured by the phenol hypochlorite colorimetric method²⁶. The results were expressed as % of inhibition of ammonia release, where 100% was the concentration of ammonia in the control, synthetic urine with *P. mirabilis*. The number of *P. mirabilis* was determined by spreading 100 µL of serially diluted suspensions on TSB agar with 0.1% phenol. Grown colonies were counted after 24 h incubation at 37 °C, to determine the number of

CFU/mL in mixed and pure cultures. In addition, at the beginning of the assay the number of *Lactobacillus* was determined by spreading the tested samples on APT agar to establish the ratio of *Proteus* to *Lactobacillus* (1:5).

Determination of crystallization and urease activity in the presence of *Lactobacillus* and lactic acid

The crystallization micromethod allowed examining the impact of *Lactobacillus* strains and lactic acid produced by them on the crystallization process and on the activity of the urease enzyme. The degree of crystallization was assessed using phenol red as a pH indicator, due to the fact that an increase in pH indicates the start of the crystallization process. At first, the influence of four tested *Lactobacillus* (*L. crispatus* 1.2, *L. crispatus* 4, *L. jensenii* 22.2 and *L. gasseri* 35.3) on crystallization caused by *P. mirabilis* strains was assessed according to the Torzewska et al. method²³. 150 µL of synthetic urine with 0.001% phenol red was added to 96-well plates with 2 µL of *P. mirabilis* (2×10^8 CFU/mL) and *Lactobacillus* cultures in proportion 1:5 (*P. mirabilis*:*Lactobacillus*). *Lactobacillus* and *Proteus* strains were cultured as described in section "Bacterial strains". Negative control was 150 µL of synthetic urine with 0.001% phenol red and positive control was pure *P. mirabilis* cultures. All wells were covered with mineral oil to prevent the release of ammonia and increase the pH in the adjacent wells, and incubated for 24 h at 37 °C. The absorbance was measured using a microplate reader Multiskan Ex (LabSystems, Helsinki, Finland) at a wavelength of 550 nm. The impact of *Lactobacillus* strains on the activity of urease from Jack bean (Serva, Heidelberg, Germany) was performed similarly. 190 µL of synthetic urine with 0.001% phenol red was added to 96-well plates with 1 µL of the urease enzyme (at the final concentration 0.105 U/mg) and 10 µL of *Lactobacillus* cultures. Positive control was synthetic urine with urease and negative control was synthetic urine. The plate was incubated at 37 °C, and every hour, up to 6 h of incubation, the absorbance was measured at a wavelength of 550 nm. The ammonia release inhibition was measured as described in section "Crystallization experiment in mixed cultures". The effect of different lactic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) concentrations (1.4 mM, 2.8 mM 5.5 mM, 11 mM, 22 mM) on urease was assessed using the same method. Briefly, 190 µL of synthetic urine with 0.001% phenol red was added to 96-well plates with 1 µL of urease and 10 µL of dilutions of lactic acid. Positive and negative controls were the same as in the assay described above. The plate was incubated at 37 °C and the absorbance was measured at a wavelength of 550 nm.

Urease inhibition assay

The assay was performed to determine the mechanism of urease inhibition by lactic acid. The method was based on the research conducted by Rashid et al.; Tan et al. and Du et al.^{27–29} with our modifications. The assay was carried out in a phosphate buffer containing 5.9 mM EDTA and 25 mM HEPES (pH 8.0) in 96-well plates. The enzymatic mixture contained: 150 µL of urea solutions (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) in different concentrations (5 mM, 10 mM, 15 mM, 30 mM, 45 mM), 40 µL of urease from the Jack bean enzyme (Serva, Heidelberg, Germany) at the final concentration 0.105 U/mg and 10 µL of lactic acid (final concentrations 11 mM, 38 mM, 55 mM, dissolved in distilled water). Distilled water was added to control samples instead of lactic acid. The plate was incubated at 37 °C at time points: 2, 5, 10, 30, 60 and 120 min, the amount of released ammonia was determined using the phenol-hypochlorite colorimetric method²⁶. The absorbance was measured after 30 min using a microplate reader Multiskan Ex (LabSystems, Helsinki, Finland) at a wavelength of 620 nm. The IC_{50} of lactic acid was determined for the 0.105 U/mg concentration of urease and 10 mM of urea in the concentration range of lactic acid from 110 to 1 mM. The IC_{50} value of lactic acid was calculated using a GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA) for the dose–response curve.

Docking study

Homology modeling of *Proteus mirabilis* urease

The sequence of the alpha subunit of *P. mirabilis* urease was obtained from UniProtKB Database³⁰ (URE1_PROMH P17086). Top-ranked templates were selected in a SwissModel homology-modeling server³¹ and obtained from the Protein Data Bank (PDB). The crystallographic structure of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease was identified as the best-matching template based on HHBlits³². (PDB 4gy7.1.A; resolution 1.49 Å, sequence identity 60.6%, sequence similarity 0.48). In the SwissModel homology-modeling, the model of *P. mirabilis* urease was built by template alignment method using ProMod3 3.2.1 Version 3.2.1³³. In ProMod3, biologically relevant non-covalently bound ligands are considered in the model if they have at least three coordinating residues in the protein, those residues are conserved in the target–template alignment and the resulting atomic interactions in the model are within the expected ranges. In our model, the interaction of amino acids at the catalytic site, including His residues, and Ni ion ligands was found to be conserved between the target and the template. Therefore, Ni ions in the template structure were identified as relevant ligands and transferred by homology to the model. Finally, the resulting model's geometry was regularized using a force field by ProMod3 tools.

The global and per-residue model quality has been assessed using the QMEAN scoring function³⁴. Global model quality estimate GMQE was 0.88, QMEANDisCo global was 0.84 ± 0.05 , QMEAN Z-score -0.97. Predicted local similarities of model and target histidine residues at the catalytic site (QMEANDisCo Local) were 0.93 for His346B, 0.93 for His272B, 0.93 for His134B, and 0.86 for His136B. The final model structure was pre-processed and optimized in Maestro Schrodinger 11.7 (Schrodinger, Inc., New York, NY, 2013). The reference structure of the Jack bean urease (.pdb file 4gy7.1) was also prepared in the Maestro Schrodinger 11.7 software for docking comparison.

Preparation of ligands

The 3D structures of L(+) lactic acid and urea were obtained in the form of .sdf files from the PubChem database (CID:612 and CID:1176, respectively)³⁵, optimized in MarvinSketch 20.14.0, 2020, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) and calculated at the DFT/B3LYP/6-31G* level (HyperChem 7.51, HyperCube Inc., Gainesville, FL, USA). Partial charges were preserved in docking experiments.

Docking experiments

Nickel 2+ ion parameters were implemented into the AutoDock 4.2.6 database and to the AutoGrid parameter files: vdW diameter, Rii 1.41 Å³⁶ and vdW well depth, epsii 0.013 kcal/mol³⁷; the remaining parameters were default as for metal ions. Kollman charges were assigned to protein atoms, charge + 2 to Ni ions. A docking area was centered at the average position of the intra- and extracellular part of a protein broadly covered catalytic center and external amino acids (80 × 80 × 80 box, grid point spacing 0.375 Å). The Lamarckian genetic algorithm was used for conformational search of a flexible ligand. Docking parameters were as follows: number of individuals in population 100, GA-LS runs 50, maximum number of energy evaluations 2.5×10^8 , maximum number of generations 27,000. The ligand docking poses were analyzed and visualized using the Protein–Ligand Interaction Profiler (PLIP 2.2.0 open source software)³⁸ and PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.4, Schrödinger, LLC.

Statistical analysis

All experiments were carried out at least in triplicate. Statistical analyses were based on the Kruskal–Wallis test and the Mann–Whitney U test, performed using TIBCO Software Inc. (2017). Statistica (data analysis software system), version 13. <http://statistica.io>. The results were considered to be statistically significant at p value < 0.05.

Results

The effect of *Lactobacillus* strains on the intensity of crystallization caused by *P. mirabilis* strains in vitro

Changes in urinary pH and in a degree of ammonia release

At the beginning of the experiment urinary pH in pure and mixed samples averaged 5.7 (data not shown). During the incubation the pH in those samples constantly increased but with a different pattern. At every hour of the experiment (except 24 h) the lowest pH (compared to the controls) was observed in the sample with *L. gasseri* 35.3. Significantly lower pH values in the tested samples were noticeable mainly in the sixth hour of incubation, whereas after 24 h the pH values were close to each other and averaged 9.0. The level of released ammonia was closely related to the pH level. The ammonia released by the action of the urease enzyme, increased the urinary pH. In Fig. 1, we can observe that in the presence of *L. gasseri* 35.3 the ammonia release was lower compared to the control. In particular, after 6 h of incubation, it was inhibited from 10% for *P. mirabilis* K8/MC to even 45% for *P. mirabilis* 5628.

Viability of *P. mirabilis* in pure and mixed cultures

At 0, 3, 6, 8, and 24 h of the assay, the number of *P. mirabilis* bacteria was determined. During the first three hours of the experiment, no significant changes in *Proteus* viability were observed in mixed cultures compared to the control. As shown in Fig. 2, after 6 h of incubation, the number of *P. mirabilis* bacteria in control samples reached a value of $2\text{--}4 \times 10^8$ CFU/mL. However, in some tested samples with *Lactobacillus* strains the growth inhibition of *P. mirabilis* strains was observed. All tested lactobacilli significantly inhibited *P. mirabilis* 5628 growth, especially in the presence of *L. gasseri* 35.3, 10 times less *P. mirabilis* 5628 bacteria were observed, compared to control (**p < 0.01). The same effect was noted in the sample with *P. mirabilis* 608/221. Inhibition of *Proteus* viability after 6 h was not observed in the remaining samples (*P. mirabilis* KP and K8/MC). It is worth mentioning that in the sample with *P. mirabilis* 5628, the inhibition of viability by the *L. gasseri* strain was still maintained after 8 h of incubation and the same effect was noted in co-culture of *P. mirabilis* KP and 608/221 with *L. crispatus* or *L. gasseri*. After 24 h the viability of *P. mirabilis* strains decreased in all samples and averaged 5×10^6 CFU/mL. Only in co-culture with *L. gasseri*, it was observed that some of the tested *P. mirabilis* strains showed greater viability than in control during this hour.

Intensity of crystallization

Intensity of crystallization in the tested samples was assessed quantitatively and qualitatively. Quantitative analyses showed that in the first three hours no significant changes in the concentration of the tested ions were observed. Nevertheless, after 6 h of incubation the most significant differences were observed between the amount of Mg²⁺ and Ca²⁺ ions in the tested samples compared to the controls (pure *P. mirabilis* cultures in synthetic urine) (Fig. 3). A significant decrease in the amount of these two ions was noted especially in the presence of the *L. gasseri* strain, in contrast to *L. jensenii* which in most cases did not exhibit such properties. This trend was the greatest in co-culture with *P. mirabilis* 5628 and *L. gasseri*, where the calcium concentration was even 10 times lower than in the control, and the amount of magnesium was up to 5 times lower after 6 h. In the presence of *L. gasseri*, a lower content of the tested ions was still observed after eight hours of incubation in co-culture with *P. mirabilis* KP and 5628. The low content of Mg²⁺ was maintained in those samples after 24 h. It is worth noting that from the eighth hour, the proportion of calcium and magnesium in the samples started changing, and higher concentrations of Mg²⁺, the main ion of struvite crystals were observed.

Observation with a phase-contrast microscope enabled a qualitative assessment of the formation of carbonate apatite and struvite crystals (Fig. 4). After 6 h, in all tested samples crystals formed in the crystallization process were smaller compared to the control or even absent, mainly in the samples with *L. gasseri* 35.3. All crystals

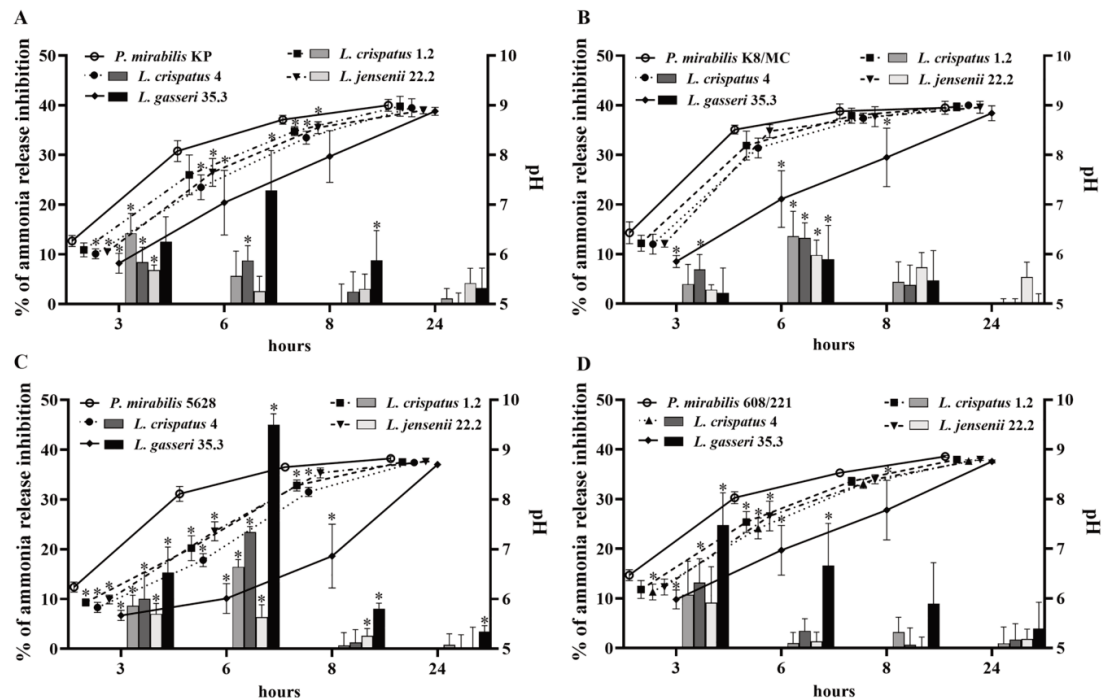


Figure 1. Percentage of ammonia release inhibition (bars) in mixed cultures in synthetic urine, where pure *P. mirabilis* samples were 100%, and changes in urinary pH (lines) in pure and mixed samples after 3, 6, 8 and 24 h of incubation. (A) Corresponds to *P. mirabilis* KP; (B) *P. mirabilis* K8/MC; (C) *P. mirabilis* 5628 and (D) *P. mirabilis* 608/221. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments; * $p < 0.05$ for comparison of the pH value and ammonia release of *P. mirabilis* pure culture vs. co-culture with *Lactobacillus*, Mann–Whitney U test.

showed „coffin-lid“-shaped appearance. The largest of struvite crystals were observed in control samples (even 90 μ m width). After 8 and 24 h of incubation, crystals were found in all samples, but they were still smaller compared to the controls.

The impact of *Lactobacillus* strains and lactic acid on crystallization and urease activity

As shown in Fig. 5A, *Lactobacillus* strains inhibited the process of crystallization caused by *P. mirabilis* strains. However, the degree of inhibition varied in the presence of different strains. *L. jensenii* 22.2 exhibited the lowest inhibition ability, while the others were found to be effective in suppressing the crystallization of all *P. mirabilis* strains. On the other hand, *Proteus* strains also showed different levels of effectiveness in this process. We distinguished strains KP and K8/MC as those exhibiting the strongest ability of urine components crystallization, as opposed to strains 5628 and 608/221. The assay with the Jack bean urease enzyme brought a lot of crucial data about the influence of *Lactobacillus* strains on the activity of this enzyme. Figure 5B (lines) shows that all *Lactobacillus* strains inhibited the enzyme activity but with different intensity. *L. gasseri* constantly caused the highest level of crystallization inhibition compared to the control and this strain also inhibited the release of ammonia the most intensively (bars). One of the main extracellular substances with antagonistic activity which are secreted by *Lactobacillus* spp. is lactic acid. Regarding this, we also investigated the impact of this acid on urease activity. The results are shown in Fig. 5C. different concentrations of lactic acid inhibited crystallization, and it was observed that with the increase in the acid concentration, the inhibition process was also intensified. Lactic acid at the concentration of 22 mM suppressed crystallization most effectively, and in its presence no increase in crystals formation was observed even after 24 h. However, the lowest concentrations (2.8 mM, 1.4 mM) inhibited the process only up to about 4 h of the experiment. The obtained results show that lactic acid produced by the tested *Lactobacillus* strains is able to inhibit the crystallization process and the level of inhibition is related to the concentration of the acid.

Mechanism of urease inhibition by lactic acid

The IC_{50} value of lactic acid was $38 \text{ mM} \pm 0.45 \text{ mM}$. Therefore, we used this concentration as well as IC_{25} (11 mM) and IC_{75} (55 mM) in the urease inhibition assay. Lactic acid inhibited urease activity in a dose-dependent manner. The Lineweaver–Burk plot showed that lactic acid interacted with a catalytic site of the enzyme, directly

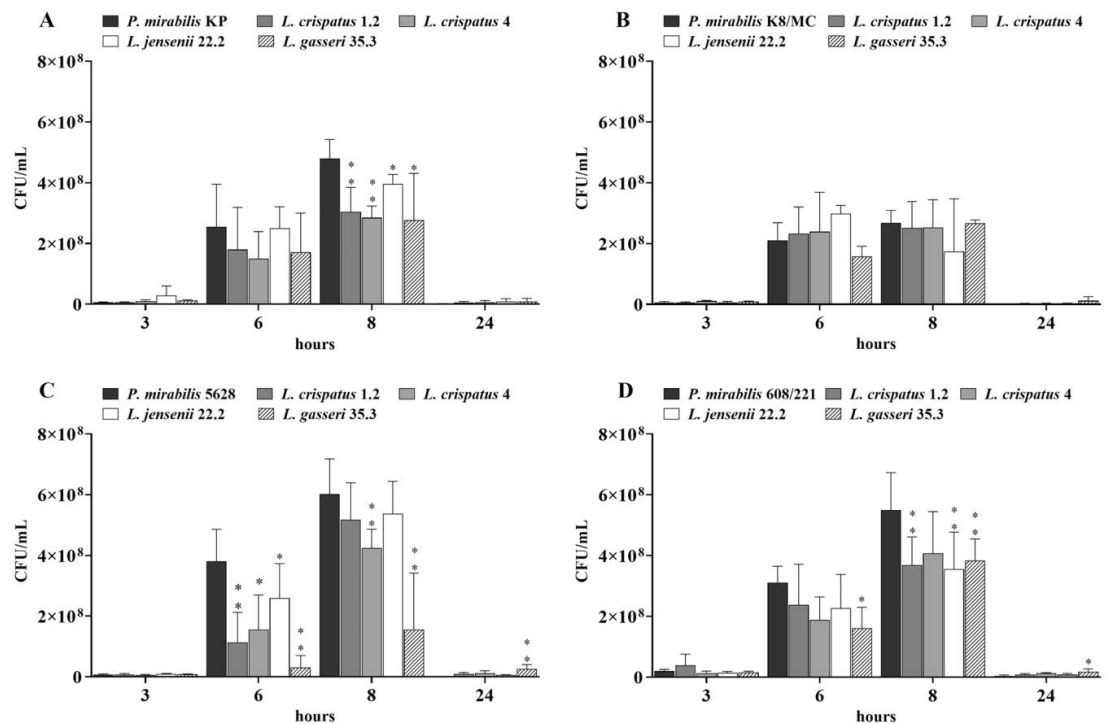


Figure 2. *P. mirabilis* viability after 3, 6, 8, and 24 h of incubation in pure and mixed cultures in synthetic urine. (A) corresponds to *P. mirabilis* KP; (B) *P. mirabilis* K8/MC; (C) *P. mirabilis* 5628 and (D) *P. mirabilis* 608/221. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ for *P. mirabilis* viability in mixed cultures vs. pure culture, Mann–Whitney U test.

competing with the substrate (Fig. 6A). The type of inhibition was indicated by changes in enzyme kinetic parameters, of which the Michaelis–Menten constant (K_m) increased with the increase of the inhibitor concentration, while the maximum reaction (V_{max}) rate remained essentially unchanged (Fig. 6A). Specifically, K_m without lactic acid was 5.06 ± 1.2 mM and V_{max} 0.45 ± 0.06 mM/min, K_m 6.6 ± 1.18 mM and V_{max} 0.45 ± 0.07 mM/min for lactic acid 11 mM, K_m 8.9 ± 1.3 mM, V_{max} 0.44 ± 0.07 mM/min for lactic acid 38 mM and K_m 10.88 ± 0.8 mM, V_{max} 0.45 ± 0.06 mM/min for lactic acid 55 mM. The K_m value increase indicated decreased affinity of urea to the active site of urease in the presence of lactic acid. However, as shown in Fig. 6B, increased concentrations of the substrate (urea) neutralized the effect of the inhibitor (lactic acid), which clearly indicates the mechanism of competitive inhibition.

Docking study

The structure of *P. mirabilis* urease was generated by the homology modeling method using the crystallographic structure of the Jack bean urease as a template (PDB 4gy7), and lactic acid (LA) was docked as a ligand, as described in the Materials and Methods. The model structure of the three subunits of *P. mirabilis* urease as a homo-trimer, binding six nickel ions in an active center is presented in Fig. 7. The two Ni ions were complexed by the linear and triangular bonds of His residues (His246 and His272, and His134, His136) and Asp360 in the active center, which are stabilized by hydrophobic interactions and hydrogen bonds of N6-carboxylated Lys (KCX) (Table S1 and Fig. S2 Supplementary Material).

Flexible docking showed the best docking position of LA in the catalytic center of *P. mirabilis* ureases in close proximity to two Ni ions and in the vicinity of the histidine residues involved in forming of salt bridges between the LA carboxylate and imidazole ring of His residues (Fig. 8A–C), or hydrogen bonds, similar to the Jack bean urease (Table S2). Two of the three residues forming hydrogen bonds with LA also participated in binding of urea (His219 and Gly277, Table S2 and Table S3). His136 involved in hydrogen bond with urea (Table S3), formed a salt bridge with LA (Table S3 and Fig. 8B, C). The estimated free energy of binding (ΔG , kcal/mol) was taken as a docking score (Autodock4.2.6). Comparison of docking of lactic acid (-8.22 kcal/mol) versus urea (-5.40 kcal/mol) revealed a remarkably better interaction of LA with an active center of *P. mirabilis* urease, as in the case of the Jack bean urease.

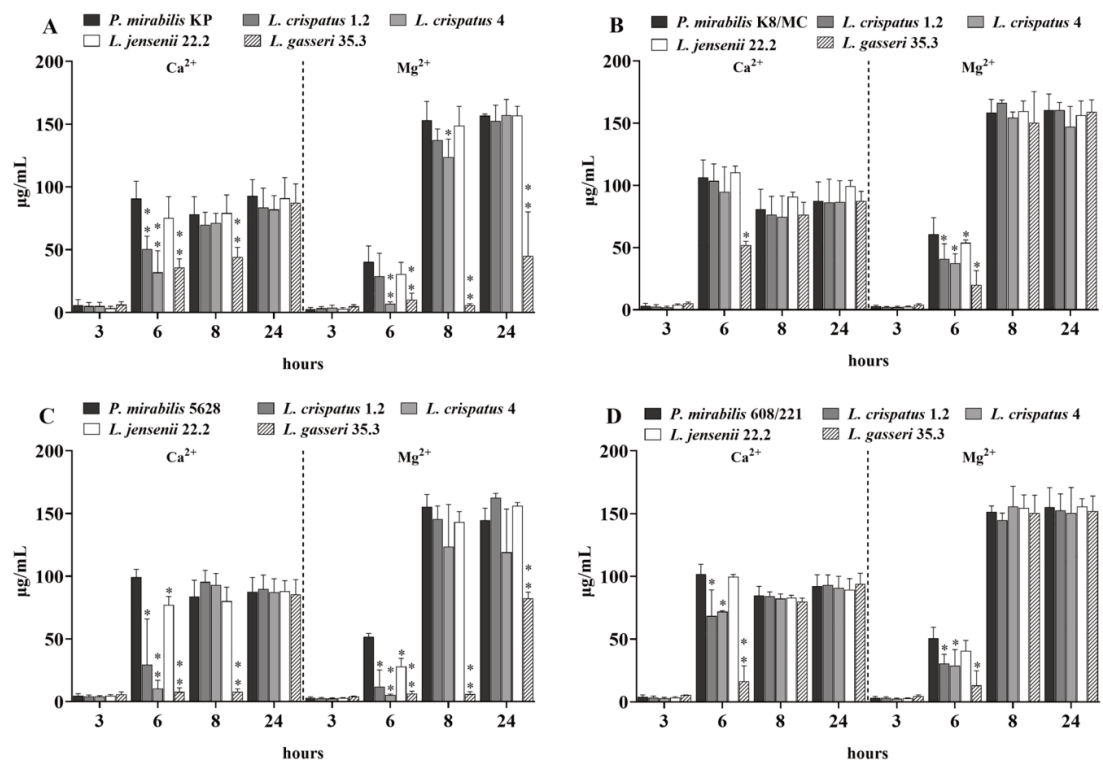


Figure 3. Calcium and magnesium concentrations in the tested and control samples after 3, 6, 8 and 24 h of incubation in synthetic urine. (A) Corresponds to *P. mirabilis* KP; (B) *P. mirabilis* K8/MC; (C) *P. mirabilis* 5628 and (D) *P. mirabilis* 608/221. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ for *P. mirabilis* viability in mixed cultures vs. pure culture, Mann–Whitney U test.

Discussion

Urinary tracts of healthy women and men are inhabited by a diverse microbiota where the dominant species are microorganisms belonging to the genus *Lactobacillus*. They play a significant role in maintaining the homeostasis of this environment and the disturbance of which could affect the development of many uropathogens^{15,39}. Many recent studies focus on the antibacterial and antibiofilm properties of natural microbiota of the urinary tract against the most common UTI pathogens such as: *Escherichia coli*, which cause approximately 80% of UTIs^{40,41}, *Proteus mirabilis*^{4,42} or *Klebsiella pneumoniae*^{43,44}. Additionally, a lot of scientific works concentrate on the practical use of selected *Lactobacillus* strains to UTIs treatment. Clinical testing such as that performed by Stapleton et al. showed that a probiotic containing *Lactobacillus* strains reduces the rate of UTI recurrence even by half⁴⁵. While most previous studies focused on *Lactobacillus* isolated from food, genital tracts or gut and their influence on UTI and comorbidities^{45–47}, our findings concerned the strains isolated from human urine and their impact on the development of urinary stones caused by bacteria. We designed our work in such a manner as to imitate the environment of the human urinary tract in order to understand how these strains influence each other, which makes this study unique. Infectious urolithiasis is one of the most common urological diseases, with an increasing morbidity rate and ineffective therapy. Due to the difficulties in the treatment and the lack of effective preventive measures for this disease, researchers have recently focused on finding alternative treatment opportunities. Research conducted by Smanthong et al.⁴⁸, about the *Sida acuta* Burm. F. ethanolic leaf extract, indicated that this extract has anti-struvite crystals properties, which makes it a potential new treatment agent. Other scientific works focused on the possibility of using compounds such as trisodium citrate⁴⁹ or herbal extracts⁵⁰.

These facts encouraged us to investigate the impact of natural microbiota of the urinary tract on the development of urinary stones caused by *P. mirabilis*. On the basis of the results of the present study, it can be concluded that some of the tested *Lactobacillus* strains are able to inhibit the crystallization of urine components. In the course of the experiments, the parameters that testify the intensity of crystallization, such as pH, ammonia release, concentration of Mg²⁺ and Ca²⁺ ions, *P. mirabilis* viability were assessed. The crystals were observed using phase-contrast microscopy. Among all the tested strains, *L. gasseri* stood out the most, showing the greatest inhibitory properties in opposition to strain *L. jensenii*. We observed that pH, release of ammonia, concentration of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions were significantly lower, up to 8 h of incubation in mixed samples with *L. gasseri* compared to the control samples. In our previous study we found that *Lactobacillus* strains had antibacterial properties and

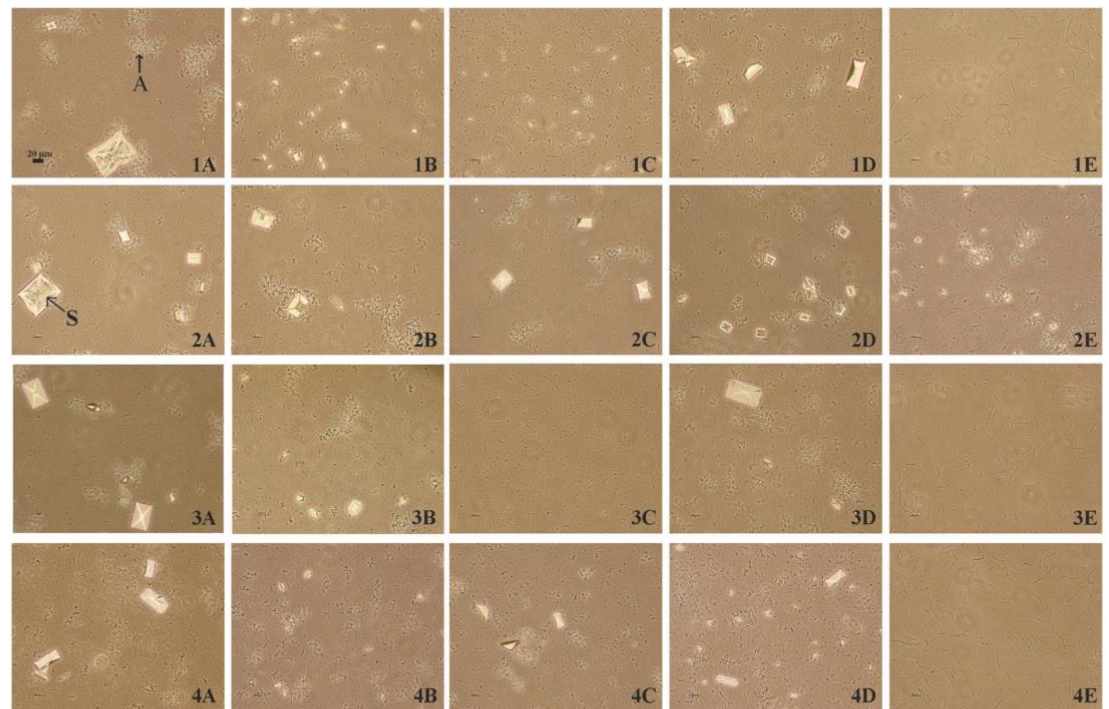


Figure 4. Carbonate apatite (A) and struvite (S) crystals in mixed and pure cultures after 6 h of incubation. (1) corresponds to *P. mirabilis* KP; (2) *P. mirabilis* K8/MC; (3) *P. mirabilis* 5628 and (4) *P. mirabilis* 608/221 and (A) control samples; (B) samples with *L. crispatus* 1.2; (C) *L. crispatus* 4; (D) *L. jensenii* 22.2 and (E) *L. gasseri* 35.3. The scale bar represents 20 μm .

abilities to inhibit the growth of *Proteus* strains at the level of up to 100%, mainly through secreted organic acids. *L. gasseri* showed the greatest antibacterial activity (72–97%) against many *P. mirabilis* strains (including those tested in this paper), while *L. jensenii* 22.2 exhibited the weakest properties¹⁴. Therefore, in the current study, the effect of these strains on the viability of *Proteus* bacteria in the environment of synthetic urine was also tested. It was assumed that this may be one of the mechanisms used by *Lactobacillus* strains to inhibit the crystallization process. Indeed, inhibition of *P. mirabilis* viability was observed in some tested samples. The strongest properties were noted in the samples with *L. gasseri* and *P. mirabilis* 5628 and 608/221 strains. In contrast to these results, the studies conducted by Torzewska et al.⁴⁷ on the effect of *Lactobacillus* strains isolated from food on the crystallization caused by *P. mirabilis* demonstrated that tested *P. mirabilis* strains showed better viability in co-culture with *Lactobacillus*, which intensified the process of crystallization. This suggests that *Lactobacillus* strains isolated from the urinary tract might have some specific properties which they developed in the particular environment. The above results, indicating that some of the tested *Lactobacillus* strains are able to inhibit the crystallization process, were confirmed using a phase-contrast microscope. After 6 h of incubation, a lower amount or lack of struvite and apatite crystals were observed in the samples with *L. gasseri* and *L. crispatus* strains. Struvite crystals are formed at pH above 7.5 and can take various morphology depending on many factors, including pH. There are coffin-shaped crystals (like those observed in our research) and X-shaped dendrite crystals, formed due to a rapid increase in the pH value⁵¹.

Our previous work¹⁴ concerned organic acids secreted by lactic acid bacteria and their antibacterial properties. We found that all of the tested *Lactobacillus* strains used in that study produced lactic and succinic acid, however *L. jensenii* was distinguished by producing the highest concentration of succinic acid and *L. crispatus* 1.2 and *L. crispatus* 4 of lactic acid. Due to the fact that for some *P. mirabilis* strains the inhibition of their viability was not observed (although the suppression of crystallization occurred), the influence of lactic acid on urease activity was investigated.

Lactobacillus strains inhibited the crystallization process even in the presence of urease without *P. mirabilis* (Fig. 5B) and this phenomenon was also observed with different concentrations of lactic acid alone (Fig. 5C). In order to confirm the hypothesis that lactic acid inhibits the crystallization process through a direct interaction with urease, we performed the enzyme activity inhibition test. So far, there are no literature data describing the mechanism of inhibiting the urease activity by lactic acid. However, it has been shown that organic acids can bind many trace metals, including nickel which is a part of the active site of urease⁵². *P. mirabilis* urease is metalloprotease, built of three subunits with a total mass of 200–700 kDa, containing a lot of cysteine and histidine

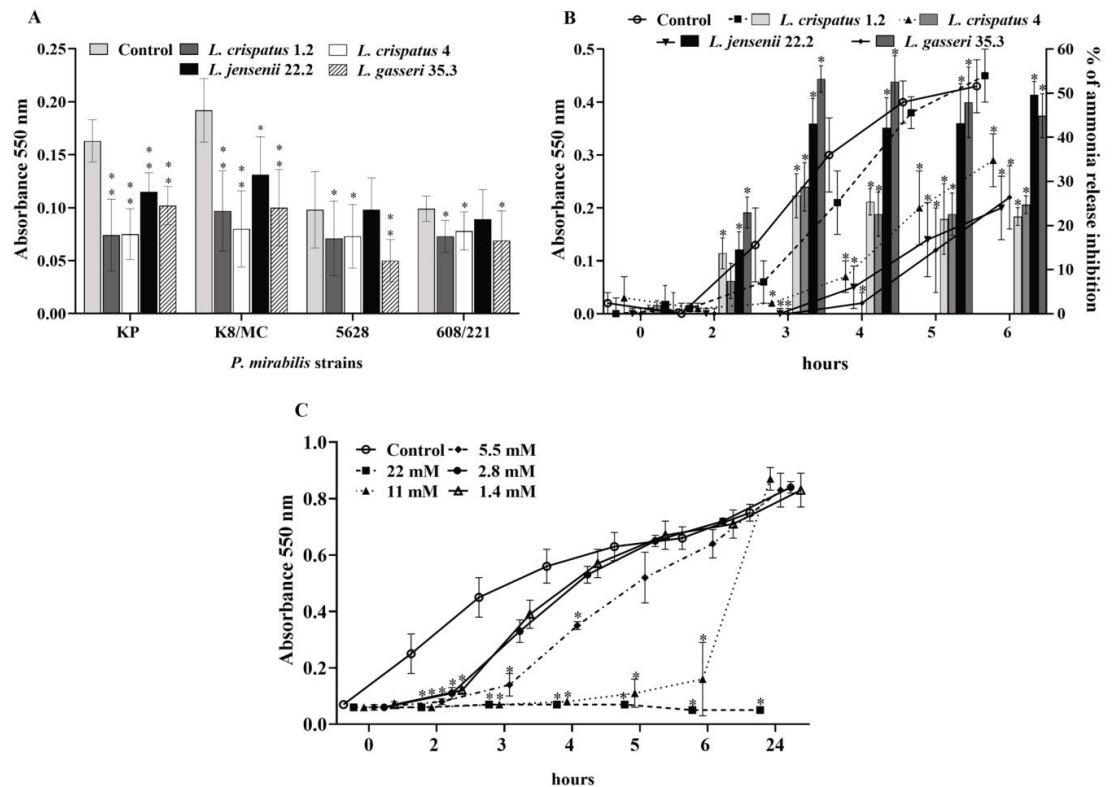


Figure 5. (A) The effect of *Lactobacillus* strains on crystallization in synthetic urine with phenol red caused by four tested *P. mirabilis* strains after 5 h of incubation in the ratio 1:5. (B) The effect of *Lactobacillus* strains on crystallization in synthetic urine with phenol red caused by the Jack bean urease (lines) and % of ammonia release inhibition (bars) in samples with *Lactobacillus* compared to the control with urease alone. (C) The effect of different concentrations of lactic acid on crystallization in synthetic urine with phenol red. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ for comparison of controls vs. tested samples, Kruskal–Wallis test.

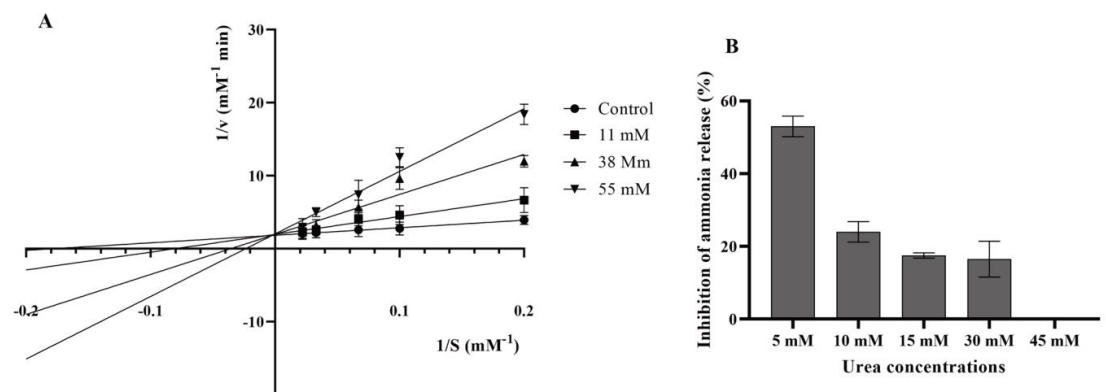


Figure 6. The Lineweaver–Burk plot showing the competitive inhibition of urease-catalysed hydrolysis of urea by different concentrations of lactic acid (A). Influence of increased concentrations of urea on urease activity in the presence of 38 mM lactic acid; data are presented as inhibition percentage of ammonia release (B); zero value means no inhibition of urease activity. The Michaelis–Menten plot of the predicted reaction rate of urea hydrolysis by urease as a function of a substrate concentration is shown in Fig. S1 (Supplementary Material).

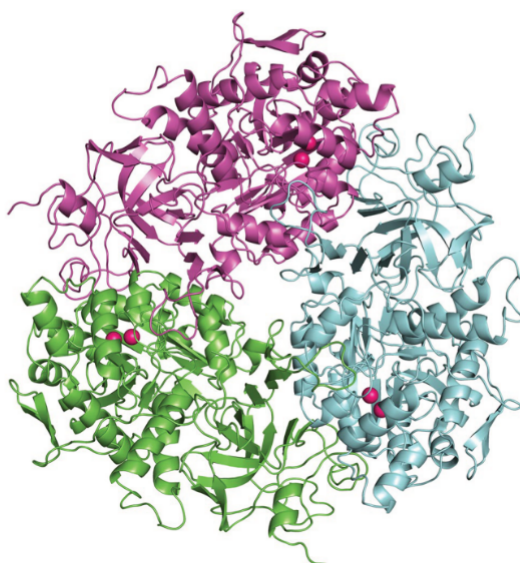


Figure 7. The three-subunit structure of *P. mirabilis* urease (homo-trimer) built using homology modeling methods; nickel ions in an active site of subunits are marked in red; three subunits are in different colors.

residues and, as already mentioned, nickel atoms in the catalytic center. Many other microorganisms produce this enzyme and it is an important factor in the pathogenicity of these bacteria⁵³. In the course of our experiments, to determine the lactic acid inhibitory activity, urease from Jack bean (*Canavalia ensiformis*) was used as a reference enzyme. Kinetic parameters of urease activity K_m and V_{max} revealed that lactic acid acts as a competitive inhibitor which binds to the active site of the enzyme. The docking experiments confirmed that lactic acid binds to the catalytic center of enzyme like competitive inhibitors, with remarkably higher affinity than urea did (scores -8 kcal/mol vs. -5 kcal/mol), which confirmed its inhibitory potency as a good ligand. In this context, lactic acid can be considered as a modulator of urease activity with pharmacological potential. Interestingly, the interaction between lactic acid and urea may involve the same histidine residues that bind urea, but in addition to hydrogen bonds (as in the case of urea), salt bridges may also be formed, stabilizing the position of lactic acid in the catalytic center of the enzyme in the ticks of histidine residues. In turn, as demonstrated by our in vitro study, the competing effect of high urea concentrations on the lactic acid residues in the enzymatic center may lead to displacing the lactic acid molecule from the site of its binding in urease. Based on in silico studies, we suggest that long-range salt bridges may be disrupted by high concentrations of urea.

To date, various types of urease inhibitors have been identified, e.g. hydroxamic acids, phosphoramidates, quinones, polyphenols or heterocyclic compounds⁵⁴. Acetohydroxamic acid (AHA) is recommended in supporting the treatment of urolithiasis. However, therapeutic application of AHA has limitations due to many side effects like risk of hemolytic anemia or leukopenia⁵⁵. Effective and safe urease inhibitors would be a breakthrough in the treatment of urolithiasis caused by urease-producing bacteria. Therefore, many researchers struggle with this issue, such as Milo S. et al.⁵⁶, who pointed out the effectiveness of another low molecular weight organic acid like 2-MA as a safer alternative to the currently used AHA acid.

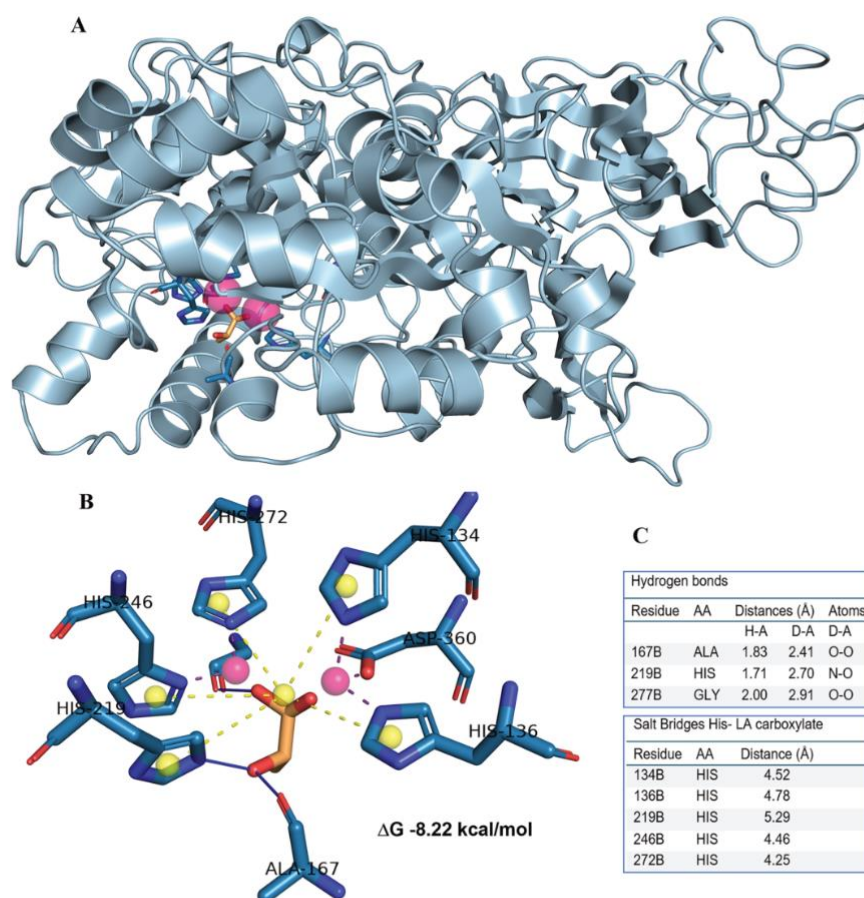


Figure 8. (A) Lactic acid (LA, in orange) docked to the catalytic center of subunit alpha of *P. mirabilis* urease located in the vicinity of two nickel ions (pink spheres). (B) The best docking pose of LA (orange) interacting with amino acids (blue tubes) in the active center of *P. mirabilis* urease, binding energy ΔG -8.22 kcal/mol (estimated K_i 0.94 μM); hydrogen bonds between LA and His219, Ala167 and Gly277 are visualized as solid lines; long-range interactions, salt bridges, between lactic acid carboxyl and imidazole groups of five histidine residues are marked as dashed yellow lines; yellow spheres are charge centers in imidazole rings and LA carboxyl; complexation of Ni ions (pink balls) are marked as dark dotted lines; hydrogen atoms are omitted for clarity. Structures were analyzed and visualized in the PLIP 2.2.0 and PyMOL 2.3.4 software. (C) A table with listed amino acids interacting with LA through hydrogen bond interaction and salt bridges; calculations in PLIP 2.2.0 software.

Conclusion

The results of our study indicate that *Lactobacillus* strains that inhabit the urinary tract are able to suppress the crystallization process, i.e. one of the initial stages of the urinary stones formation. In the course of the presented studies, we showed that their antagonistic effect is multidirectional, and in addition to the antibacterial properties against *P. mirabilis*, lactic acid produced by them affects the activity of urease through interaction with the catalytic domain of the enzyme. These studies are preliminary and their continuation on an in vivo model will confirm the usefulness of this lactic acid as a factor supporting the treatment of urolithiasis.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Received: 9 June 2023; Accepted: 3 January 2024

Published online: 10 January 2024

References

- Lang, J., Narendrula, A., El-Zawahry, A., Sindhwani, P. & Ekwenna, O. Global trends in incidence and burden of urolithiasis from 1990 to 2019: An analysis of global burden of disease study data. *Eur. Urol. open Sci.* **35**, 37–46 (2022).
- Sorokin, I. et al. Epidemiology of stone disease across the world. *World J. Urol.* **35**, 1301–1320 (2017).
- Bartolletti, R. et al. Epidemiology and risk factors in urolithiasis. *Urol. Int.* **79**(Suppl 1), 3–7 (2007).
- Abboud, I. A. Mineralogy and chemistry of urinary stones: Patients from North Jordan. *Environ. Geochem. Health* **30**, 445–463 (2008).
- Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, J., Deng, Q. & Liang, H. Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation (review). *Int. J. Mol. Med.* **48**, 149 <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4982> (2021).
- Liu, Y. et al. Epidemiology of urolithiasis in Asia. *Asian J. Urol.* **5**, 205–214 (2018).
- Flannigan, R., Choy, W. H., Chew, B. & Lange, D. Renal struvite stones—Pathogenesis, microbiology, and management strategies. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 333–341 (2014).
- Mazzei, L., Musiani, F. & Ciurli, S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: Tale of a long debate. *J. Biol. Inorg. Chem.* **25**, 829–845 (2020).
- Kramer, G., Klingler, H. C. & Steiner, G. E. Role of bacteria in the development of kidney stones. *Curr. Opin. Urol.* **10**, 35–38 (2000).
- Bichler, K. H. et al. Urinary infection stones. *Int. J. Antimicrob. Agents* **19**, 488–498 (2002).
- Prywer, J. & Torzewska, A. Aggregation of poorly crystalline and amorphous components of infectious urinary stones is mediated by bacterial lipopolysaccharide. *Sci. Rep.* **9**, 1–14 (2019).
- Marien, T. & Miller, N. L. Treatment of the infected stone. *Urol. Clin. N. Am.* **42**, 459–472 (2015).
- Khusid, J. A., Hordines, J. C., Sadiq, A. S., Atallah, W. M. & Gupta, M. Prevention and management of infectious complications of retrograde intrarenal surgery. *Front. Surg.* **8**, 718583. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2021.718583> (2021).
- Szczerbic, D., Piechocka, J., Glowacki, R. & Torzewska, A. Organic acids secreted by *Lactobacillus* spp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Molecules* **27**, 5557. <https://doi.org/10.3390/molecules27175557> (2022).
- Aragón, I. M. et al. The urinary tract microbiome in health and disease. *Eur. Urol. Focus* **4**, 128–138 (2018).
- Gottschick, C. et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome* **5**, 99. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0305-3> (2017).
- Kenneally, C., Murphy, C. P., Sleator, R. D. & Culligan, E. P. The urinary microbiome and biological therapeutics: Novel therapies for urinary tract infections. *Microbiol. Res.* **259**, 127010. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127010> (2022).
- Klein, R. D. & Hultgren, S. J. Urinary tract infections: Microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 211–226 (2020).
- Ray, K. *Lactobacillus* probiotic could prevent recurrent UTI. *Nat. Rev. Urol.* **8**, 292–292 (2011).
- Liu, Y. et al. *Lactiplantibacillus plantarum* reduced renal calcium oxalate stones by regulating arginine metabolism in gut microbiota. *Front. Microbiol.* **12**, 743097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743097> (2021).
- Lieske, J. C. Probiotics for prevention of urinary stones. *Ann. Transl. Med.* **5**, 29. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.11.86> (2017).
- Griffith, D. P., Musher, D. M. & Itin, C. Urease: The primary cause of infection-induced urinary stones. *Invest. Urol.* **13**, 346–350 (1976).
- Torzewska, A., Bednarska, K. & Różalski, A. Influence of various uropathogens on crystallization of urine mineral components caused by *Proteus mirabilis*. *Res. Microbiol.* **170**, 80–85 (2019).
- Prywer, J. & Torzewska, A. Biomimetic mineralization of struvite crystals by *Proteus mirabilis* from artificial urine and their mesoscopic structure. *Cryst. Res. Technol.* **45**, 1283–1289 (2010).
- Prywer, J., Kozanecki, M., Mielniczek-Brzóska, E. & Torzewska, A. Solid phases precipitating in artificial urine in the absence and presence of bacteria *Proteus mirabilis*—A contribution to the understanding of infectious urinary stone formation. *Crystal* **8**, 164. <https://doi.org/10.3390/cryst8040164> (2018).
- Weatherburn, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**, 971–974 (1967).
- Rashid, M. et al. Enzyme inhibitory kinetics and molecular docking studies of halo-substituted mixed ester/amide-based derivatives as Jack Bean urease inhibitors. *Biomed. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2020/8867407> (2020).
- Tan, L. et al. Kinetics and mechanism study of competitive inhibition of Jack-Bean urease by baicalin. *Sci. World J.* **2013**, 879501. <https://doi.org/10.1155/2013/879501> (2013).
- Du, N. et al. Kinetics and mechanism of jack bean urease inhibition by Hg²⁺. *Chem. Center J.* **6**, 1–7 (2012).
- Bateman, A. et al. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* **51**, D523–D531 (2023).
- Waterhouse, A. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303 (2018).
- Steinegger, M. et al. HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. *BMC Bioinform.* **20**, 1–15 (2019).
- Studer, G. et al. ProMod3-A versatile homology modelling toolbox. *PLoS Comput. Biol.* <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008667> (2021).
- Studer, G. et al. QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* **36**, 1765–1771 (2020).
- Kim, S. et al. PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res.* **51**, D1373–D1380 (2023).
- Shannon, R. D. & IUCr. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *urn:issn:0567-7394* **32**, 751–767 (1976).
- Sindhikara, D. J., Roitberg, A. E. & Merz, K. M. Apo and nickel-bound forms of the *Pyrococcus horikoshii* species of the metalloregulatory protein: NikR characterized by molecular dynamics simulations. *Biochemistry* **48**, 12024–12033 (2009).
- Adasme, M. F. et al. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Res.* **49**, W530–W534 (2021).
- Perez-Carrasco, V., Soriano-Lerma, A., Soriano, M., Gutiérrez-Fernández, J. & García-Salcedo, J. A. Urinary microbiome: Yin and Yang of the urinary tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 617002. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.617002> (2021).
- Soltani, N. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of *Lactobacillus* strains secretome and extraction against *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. *Biotechnol. Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00760> (2022).
- Dawwam, G. E., Saber, I. I., Hisham Yassin, M. & Ibrahim, H. F. Probiotics: Lactic acid bacteria have antibacterial activity and downregulate biofilm genes of uropathogenic *E. coli*. *J. Pure Appl. Microbiol.* **16**, 1834–1843 (2022).
- Shaaban, M., El-Rahman, O. A. A., Al-Qaidi, B. & Ashour, H. M. Antimicrobial and antibiofilm activities of probiotic *Lactobacilli* on antibiotic-resistant *Proteus mirabilis*. *Microorganisms* **8**, 1–13 (2020).
- Tang, H. J. et al. The effect of *Lactobacillus* with probiotics on KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* **13**, 4776. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1050247> (2022).
- Kheiri, F., Kermanshahi, R. K. & Feizabadi, M. M. The inhibitory effects of *Lactobacillus* supernatants and their metabolites on the growth and biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Disord. Drug Targets* **20**, 902–912 (2020).
- Stapleton, A. E. et al. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin. Infect. Dis.* **52**, 1212–1217 (2011).
- Kim, H. N. et al. Gut microbiota and the prevalence and incidence of renal stones. *Sci. Rep.* **12**, 3732. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07796-y> (2022).

47. Torzewska, A., Wiewiura, P., Brodecka, D., Szczerbiec, D. & Róžalski, A. Potentially probiotic *Lactobacillus* strains derived from food intensify crystallization caused by *Proteus mirabilis* in urine. *Probiot. Antimicrob. Proteins* **13**, 441–452 (2021).
48. Smanthong, N. *et al.* Anti-proteus activity, anti-struvite crystal, and phytochemical analysis of *Sida acuta* Burm. F. ethanolic leaf extract. *Molecules* **27**, 1092. <https://doi.org/10.3390/molecules27031092> (2022).
49. Prywer, J. *et al.* Struvite crystal growth inhibition by trisodium citrate and the formation of chemical complexes in growth solution. *JCrGr* **418**, 92–101 (2015).
50. Bindhu, B. & Thambi, T. A. Formation and microanalysis of struvite urinary calculi. *Int. J. Eng. Res. Appl.* **2**, 1480–1485 (2019).
51. Manzoor, M. A. P., Mujeeburahiman, M., Duwal, S. R. & Rekha, P. D. Investigation on growth and morphology of in vitro generated struvite crystals. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **17**, 566–570 (2019).
52. Agha, A., Opekun, A. R., Abudayyeh, S. & Graham, D. Y. Effect of different organic acids (citric, malic and ascorbic) on intragastric urease activity. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **21**, 1145–1148 (2005).
53. Broll, V. *et al.* Non-enzymatic properties of *Proteus mirabilis* urease subunits. *Process Biochem.* **110**, 263–274 (2021).
54. Kafarski, P. & Talma, M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *J. Adv. Res.* **13**, 101–112 (2018).
55. Downey, J. A., Nickel, J. C., Clapham, L. & McLean, R. J. C. In vitro inhibition of struvite crystal growth by acetohydroxamic acid. *Br. J. Urol.* **70**, 355–359 (1992).
56. Milo, S. *et al.* A small-molecular inhibitor against *Proteus mirabilis* urease to treat catheter-associated urinary tract infections. *Sci. Rep.* **11**, 1–15 (2021).

Author contributions

D.S.-conception of research, execution of experiments and elaboration of results, writing the manuscript, K.B.-S.-participation in the development of the research methodology for urease inhibition and preparation of the manuscript, conducting molecular docking studies, A.T. conception of research, development of the methodology and research plan, review and editing of manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51323-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.T.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Supplementary Information

Title: Antibacterial properties and urease suppression ability of *Lactobacillus* inhibit the development of infectious urinary stones caused by *Proteus mirabilis*

Authors: Dominika Szczepiec, Katarzyna Bednarska-Szczepaniak, Agnieszka Torzewska

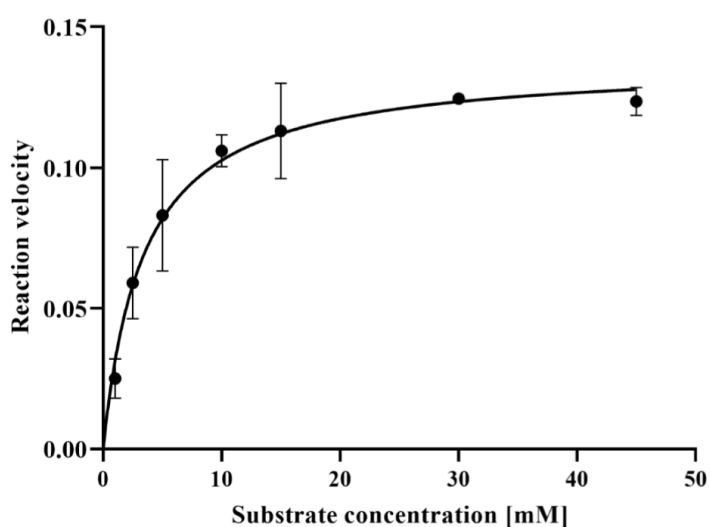


Fig. S1. Michaelis-Menten kinetics of Jack bean urease, with the substrate urea. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) of three experiments.

Tab. S1. Metal complexes formed by two Ni ions and amino acids in catalytic centers of *P. mirabilis* urease (model) and Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease (PDB 4gy7), predicted by PLIP.

Metal Complexes	<i>Proteus mirabilis</i>			<i>Canavalia ensiformis</i>		
	Residue	AA	Distance (Å)	Residue	AA	Distance (Å)
Ni, linear						
1	246B	HIS	1.95	519B	HIS	2.08
2	272B	HIS	1.99	545B	HIS	2.08
Ni, trigonal.pyramidal						
1	134B	HIS	2.17	407B	HIS	2.11
2	136B	HIS	2.00	409B	HIS	2.06
3	360B	ASP	1.89	633B	ASP	2.05

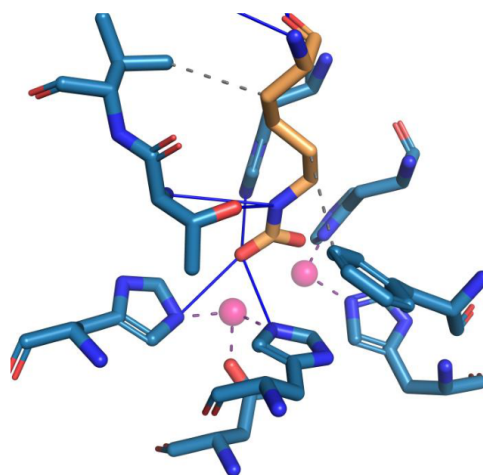


Fig. S2. Graphical representation of a catalytic center of *P. mirabilis* urease, complexes of Ni ions with amino acids are shown. The homology model of *P. mirabilis* urease was built on Jack bean urease crystallographic structure (PDB 4gy7, 1.49 Å resolution). His residues and Asp are marked in blue, orange – N6-carboxylated Lys, pink – Ni ions; dotted lines –hydrophobic interactions; dashed lines at Ni atoms – metal complexation; solid lines – hydrogen bonds; hydrogen atoms are omitted for clarity.

Tab. S2. Lactic acid (LA) interacting with amino acids of *P. mirabilis* and *Canavalia ensiformis* urease catalytic centers. Five His residues (*P.m* His134, His136, His219, His246, His272) form salt bridges with LA carboxylate.

<i>Proteus mirabilis</i>					<i>Canavalia ensiformis</i>				
Hydrogen bonds					Hydrogen bonds				
Residue	AA	Distances (Å)		Atoms	Residue	AA	Distances (Å)		Atoms
		H-A	D-A	D-A			H-A	D-A	D-A
167B	ALA	1.83	2.41	O-O	440B	ALA	1.93	2.51	O-O
219B	HIS	1.71	2.70	N-O	492B	HIS	1.88	2.82	N-O
277B	GLY	2.00	2.91	O-O	519B	HIS	3.55	3.93	N-O
					550B	GLY	1.83	2.69	O-O
Salt Bridges His- LA carboxylate					Salt Bridges His- LA carboxylate				
Residue	AA	Distance (Å)			Residue	AA	Distance (Å)		
134B	HIS	4.52			407B	HIS	4.43		
136B	HIS	4.78			409B	HIS	4.93		
219B	HIS	5.29			492B	HIS	5.35		
246B	HIS	4.46			519B	HIS	4.60		
272B	HIS	4.25			545B	HIS	4.28		

H – hydrogen atoms; A – acceptor, D – donor.

Tab. S3. Urea forming hydrogen bonds with amino acids of *P. mirabilis* and *Canavalia ensiformis* urease catalytic centers.

<i>Proteus mirabilis</i>					<i>Canavalia ensiformis</i>				
Hydrogen bonds					Hydrogen bonds				
Residue	AA	Distances (Å)		Atoms	Residue	AA	Distances (Å)		Atoms
136B	HIS	2.48	2.98	N-N	407B	HIS	2.7	3.6	N-N
219B	HIS	3	3.74	N-O	409B	HIS	2.17	2.8	N-N
277B	GLY	2.18	3.16	N-O	492B	HIS	2.35	3.23	N-O
363B	ALA	2.17	2.97	N-O	519B	HIS	1.87	2.65	N-O
					545B	HIS	2.36	3.23	N-O
					636B	ALA	2.16	3.1	N-O
					636B	ALA	2.74	3.57	N-O

III.3. Publikacja 3

Szczerbiec D., Słaba M., Torzewska A. *Substances Secreted by Lactobacillus spp. From the Urinary Tract Microbiota Play a Protective Role against Proteus mirabilis Infections and Their Complications*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 103.
doi: 10.3390/ijms25010103



Article

Substances Secreted by *Lactobacillus* spp. from the Urinary Tract Microbiota Play a Protective Role against *Proteus mirabilis* Infections and Their Complications

Dominika Szczerbic¹, Mirosława Ślaba² and Agnieszka Torzewska^{1,*}

¹ Department of Biology of Bacteria, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; dominika.szczerbic@biol.uni.lodz.pl

² Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; mirosława.slaba@biol.uni.lodz.pl

* Correspondence: agnieszka.torzewska@biol.uni.lodz.pl

Abstract: *Proteus mirabilis* urinary tract infections can lead to serious complications such as development of urinary stones. *Lactobacillus* spp., belonging to the natural microbiota of the urinary tract, exhibit a number of antagonistic mechanisms against uropathogens, including the secretion of organic acids. In this study, we determined the anti-adhesion, anti-cytotoxicity and anti-crystallization properties of the substances secreted by *Lactobacillus*. For this purpose, membrane inserts with a pore diameter 0.4 µm were used, which prevent mixing of cultured cells, simultaneously enabling the diffusion of metabolic products. The intensity of crystallization was assessed by measuring the levels of Ca²⁺, Mg²⁺ and NH₃ and by observing crystals using microscopic methods. The cytotoxicity of the HCV-29 cell line was determined using the LDH and MTT assays, and the impact of lactobacilli on *P. mirabilis* adhesion to the bladder epithelium was assessed by establishing CFU/mL after cell lysis. It was shown that in the presence of *L. gasseri* the adhesion of *P. mirabilis* and the cytotoxicity of the cells decreased. The degree of crystallization was also inhibited in all experimental models. Moreover, it was demonstrated that *L. gasseri* is characterized by the secretion of a high concentration of L-lactic acid. These results indicate that L-lactic acid secreted by *L. gasseri* has a significant impact on the crystallization process and pathogenicity of *P. mirabilis*.

Keywords: *Proteus mirabilis*; *Lactobacillus*; organic acid; urinary tract infections; urolithiasis



Citation: Szczerbic, D.; Ślaba, M.; Torzewska, A. Substances Secreted by *Lactobacillus* spp. from the Urinary Tract Microbiota Play a Protective Role against *Proteus mirabilis* Infections and Their Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 103. <https://doi.org/10.3390/ijms25010103>

Academic Editors: Julio Villena and Haruki Kitazawa

Received: 22 November 2023

Revised: 15 December 2023

Accepted: 18 December 2023

Published: 20 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Proteus mirabilis is a Gram-negative bacterium, widely distributed in nature, including the human intestine, where it is a component of natural microbiota. It is also a common pathogen of the gastrointestinal and urinary tracts. Urinary tract infections caused by *P. mirabilis* are most often associated with urinary tract catheterization (CAUTIs) [1,2]. *P. mirabilis* accounts for 1–2% of all urinary tract infections (UTIs) and 20–45% of complicated UTIs, e.g., infections associated with long term catheterization, worldwide [3]. Urinary tract infections caused by the bacteria of the genus *Proteus* begin with the colonization of the urinary tract and migration of the pathogen to the bladder and kidneys. These stages are made possible by numerous virulence factors, including the presence of fimbriae, which enable the adhesion of bacteria to the urinary tract epithelium, swarming motility, which is crucial in dissemination of bacteria and production of urease-metalloenzyme, which catalyzes the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide. Ammonia released by the action of urease has a toxic effect, damaging the epithelial cells of the urinary tract and promoting infections [4,5]. *P. mirabilis* infections can lead to numerous complications such as pyelonephritis, bacteriuria and development of infection-related urinary stones (also called infectious stones or infection stones). The formation process of these stones is related to the action of urease and they constitute up to 15% of all kidney stones [6]. The

mechanism of their formation begins with an increase in urine pH due to the urease activity. Urea hydrolysis into ammonia and carbon dioxide causes an increase in the concentrations of NH_4^+ , PO_4^{3-} and CO_3^{2-} ions. Cooperatively with Mg^{2+} and Ca^{2+} ions, it leads to the formation of struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and carbonate apatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$) [7]. This process is one of the first stages of urinary stone development and consists of the precipitation of mineral components of urine caused by their excessive concentration in relations to the solubility which leads to crystallization. Struvite and apatite crystals may be washed out by the urine stream or crystals retention may occur in the urinary system. It leads to aggregation and rapid formation of larger forms in the lumen of the bladder or within the kidneys. As a result, it can lead to dangerous complications such as sepsis, renal failure or blocking of the flow of urine through catheters [6].

The structure of urinary stones and the presence of deep crevices allow bacteria to survive during antibiotic therapy and protect them from host immune defense. Moreover, *P. mirabilis* bacteria are able to invade cells and persist inside them, which can lead to intracellular crystallization [8]. Those facts have a huge impact on the treatment of infectious urolithiasis, which is a disease characterized by frequent relapses, ineffective treatment and lack of preventive measures without side effects. The treatment of urease-induced stones includes antibiotic therapy to eliminate the source of infection and removal of the stone using percutaneous nephrolithotomy (PCNL) or shock wave lithotripsy (SWL). Additionally, pharmacologic preventative measures including acidification of the urine or inhibition of urease are applied [6,9,10].

Due to the difficulties in treatment, new therapy options are being sought. It may be interesting to use microorganisms that naturally inhabit the urinary tract. The microbiota of the urinary tracts ensures homeostasis and is crucial in the maintenance of health. The microbes interact with pathogens in multiple ways by producing antimicrobial substances, competing with pathogens for common resources or enhancing epithelial defenses including immune defenses [11]. *L. jensenii* and *L. gasseri* are among the *Lactobacillus* strains most frequently isolated from the urinary tract [12]. The principle extracellular molecules secreted by lactobacilli are organic acids. There are many reports about organic acids and their inhibitory activity against various urogenital tract pathogens such as *Candida albicans*, *C. glabrata* [13], *Chlamydia trachomatis* [14] and *Escherichia coli* [15]. So far, many works have focused on the impact of probiotic strains on the health of the vaginal system; however, there are few reports on the influence of lactobacilli, which belong to the natural microbiota of the urinary tract, and the substances secreted by them on UTIs and infectious stones development.

The purpose of the present study was to investigate the influence of extracellular substances secreted by *L. jensenii* and *L. gasseri* on the adhesion of *P. mirabilis* to the bladder epithelium and cell cytotoxicity. Moreover, the research was aimed at determining the intensity of crystallization caused by *P. mirabilis* in the presence of these substances.

2. Results

2.1. Extracellular Substances Secreted by *Lactobacillus* May Reduce the Adhesion of *P. mirabilis* Strains to the Bladder Epithelium In Vitro

One of the first steps in *P. mirabilis* urinary tract infections is the adhesion of bacteria to the urothelium surface. This work was focused on the impact of the substances secreted by *Lactobacillus* on this process. The results of anti-adhesion properties of *L. jensenii* and *L. gasseri* against *P. mirabilis* strains are shown in Figure 1. The adhesion of *P. mirabilis* KP and 5628 was significantly reduced in the presence of the substances secreted by *L. gasseri* strain, whereas such a phenomenon was not observed in the presence of *L. jensenii*. Extracellular substances of *L. gasseri* reduced the adhesion of the *P. mirabilis* KP strain to the urothelium by up to 70% (* $p < 0.05$) and in the case of *P. mirabilis* 5628 the reduction was up to 45% (* $p < 0.05$). There were no significant changes observed in the adhesion of *P. mirabilis* K8/MC to the epithelium in the presence of the substances secreted by *Lactobacillus* strains.

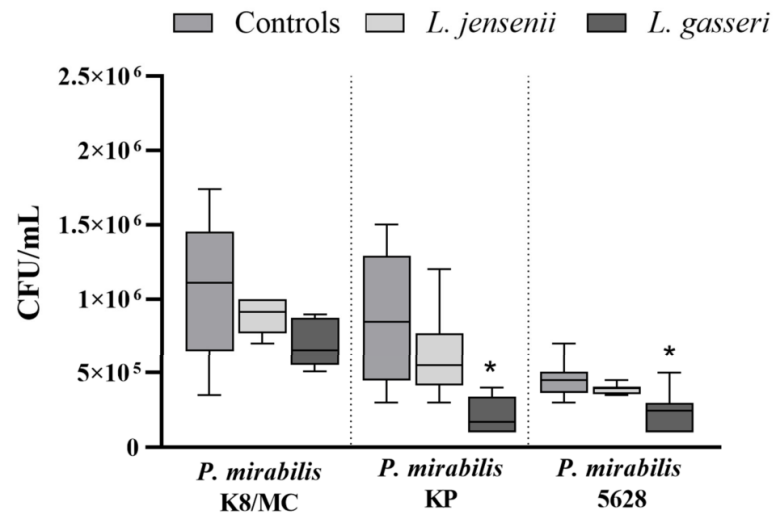


Figure 1. Adhesion of *P. mirabilis* to the bladder epithelium cell line HCV-29 during the incubation in the presence of substances secreted by *Lactobacillus* using the cell culture inserts system. The results are presented as median $\pm$ interquartile range (IQR) of three experiments. * $p < 0.05$ for comparison of the number of *P. mirabilis* bacteria (CFU/mL) in pure culture vs. in the presence of extracellular substances of *Lactobacillus*, Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparisons.

The inhibition of the adhesion of *P. mirabilis* to the bladder epithelium as a result of the action of the extracellular substances of *Lactobacillus* was also confirmed by microscopic observation (Figure 2). All *P. mirabilis* strains showed the ability to adhere to the HCV-29 cell line in vitro as well as to the surface of the polystyrene plate. However, in the presence of the substances secreted by the *L. gasseri* strain, an inhibition in the number of the *P. mirabilis* KP and 5628 bacteria and their adherence properties was observed, which was consistent with the obtained quantitative results.

2.2. The Impact of the Substances Secreted by *Lactobacillus* on Cell Cytotoxicity Induced by *P. mirabilis*

The LDH and MTT assays were performed to investigate the role of the extracellular substances on the cytotoxicity effect induced by the *P. mirabilis* strains on the bladder epithelium. The LDH assay is based on the measurement of the levels of lactate dehydrogenase released into the culture medium upon plasma membrane damage and is expressed as a percentage of cell death, whereas the MTT assay is used to measure cellular metabolic activity and can be expressed as a percentage of cell viability [16]. The level of bladder cell cytotoxicity induced by the *P. mirabilis* strains after 24 h was high. The percentage of eukaryotic cell death caused by all *P. mirabilis* strains in the presence of *L. jensenii* was also high (on average 90%, where 100% were *P. mirabilis* pure cultures) (Figure 3a). However, *L. gasseri* significantly reduced this effect in the co-culture with all *P. mirabilis* strains (* $p < 0.05$). The strongest inhibition of eukaryotic cell death (by 35%) was noticed in the culture with *P. mirabilis* 5628 and extracellular substances of *L. gasseri*. Conversely, as shown in Figure 3b, cell viability after 24 h of incubation was low and remained at the level of 3% for *P. mirabilis* KP and 10% for *P. mirabilis* K8/MC. The viability of eukaryotic cells in the samples with the addition of *Lactobacillus* strains was higher than in those with *P. mirabilis* alone. In particular, the substances secreted by *L. gasseri* had an impact on cell cytotoxicity induced by *P. mirabilis* 5628, where even five times higher cell viability was noticed (* $p < 0.05$).

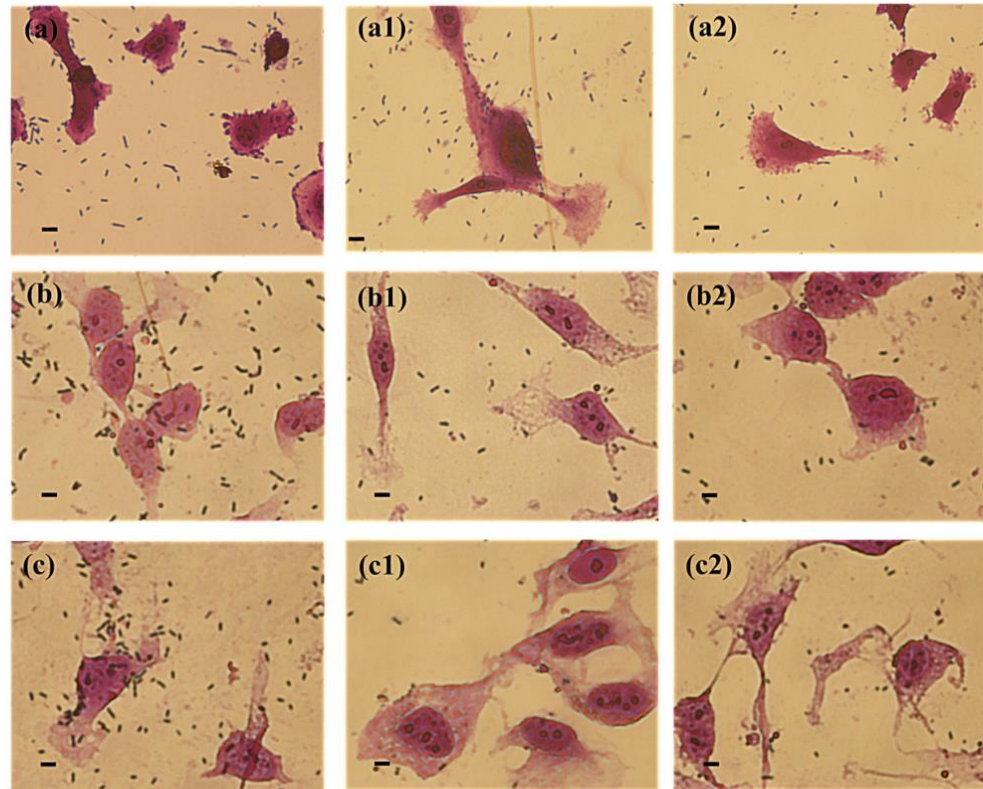


Figure 2. Adhesion of the *P. mirabilis* strains ((a) K8/MC; (b) KP, (c) 5628) to the bladder epithelium cell line HCV-29 in the presence of extracellular substances secreted by *L. jensenii* (1) and *L. gasseri* (2) using the cell culture inserts system. The scale bar represents 10 μ m.

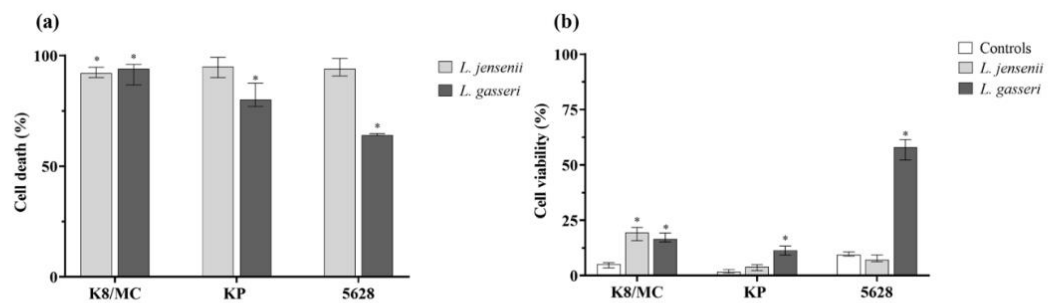


Figure 3. Percentage of cell death in the presence of the extracellular substances secreted by *L. jensenii* and *L. gasseri* strains, where 100% was pure *P. mirabilis* and bladder cell line HCV-29 in RPMI with synthetic urine (a). Percentage of cell viability in pure culture of *P. mirabilis* strains and bladder cell line HCV-29 in RPMI with synthetic urine as controls and in the presence of the extracellular substances secreted by *L. jensenii* and *L. gasseri* strains (b). The results are presented as median $\pm$ interquartile range (IQR) of four experiments. * $p < 0.05$ for the comparison of cell death and cell viability of *P. mirabilis* bacteria in the presence of *L. jensenii* and *L. gasseri* strains vs. in pure cultures. Mann–Whitney U test.

2.3. Extracellular Substances of *Lactobacillus* Inhibit the Crystallization of Urine Components Caused by *P. mirabilis*

The influence of the *Lactobacillus* strains and the secreted substances on the intensity of crystallization was assessed by determining the degree of ammonia release and concentrations of Mg^{2+} and Ca^{2+} ions and by observing the crystals under a microscope. Urease hydrolyzes urea, which leads to an increase in the pH value and release of ammonia. As shown in Figure 4, in the presence of *L. gasseri* and *L. jensenii*, ammonia release was inhibited compared to the controls—pure *P. mirabilis* cultures in synthetic urine. Especially the *L. gasseri* strain showed such properties in the co-culture with *P. mirabilis* KP, where after 6 h of incubation the ammonia release inhibition reached the level of 40% (** $p < 0.03$) compared to the control. In the culture with *P. mirabilis* K8/MC, the *Lactobacillus* strains showed the weakest ability to inhibit the release of ammonia, which remained at a maximum of 10% at 6 h and then decreased till 24 h of the experiment.

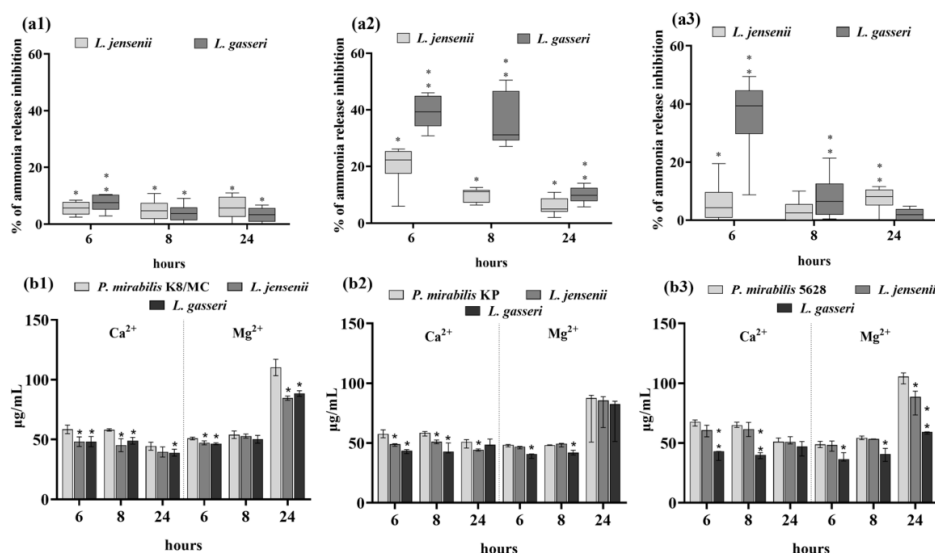


Figure 4. Percentage of ammonia release inhibition in the culture with the *P. mirabilis* strains in synthetic urine and the extracellular substances secreted by *Lactobacillus* after 6, 8 and 24 h of incubation (a). Intensity of crystallization expressed as the concentration of Mg^{2+} and Ca^{2+} in the culture with *P. mirabilis* strains in synthetic urine and the extracellular substances secreted by *Lactobacillus* after 6, 8 and 24 h of incubation (b). (1) corresponds to *P. mirabilis* K8/MC, (2) to *P. mirabilis* KP and (3) to *P. mirabilis* 5628. The results are presented as median $\pm$ interquartile range (IQR) of three experiments. ** $p < 0.03$, * $p < 0.05$ for comparison of ammonia release in pure culture vs. in the presence of *Lactobacillus* extracellular substances using Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparisons and for comparison of Ca^{2+} and Mg^{2+} ion concentrations in pure culture vs. in the presence of *Lactobacillus* extracellular substances using Mann–Whitney U test.

In the presence of *L. gasseri*, lower concentrations of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions compared to the controls were also observed. This trend was the strongest in the culture with *P. mirabilis* 5628, where the calcium content after 6 h of incubation was almost two times lower than in control (** $p < 0.03$). In the culture of *P. mirabilis* K8/MC and *P. mirabilis* KP, a decrease in the calcium content was noted in the presence of both *Lactobacillus* strains mainly after 6 and 8 h of incubation. Also, only a slight decrease in the magnesium content was observed in the presence of *L. gasseri* after 6 and 8 h of incubation with all *P. mirabilis* strains. After 24 h of incubation, there was a decrease in Mg^{2+} concentration in the culture with *P. mirabilis* K8/MC and 5628 and substances secreted by *Lactobacillus*.

Phase-contrast microscopy images confirmed that in the samples with *P. mirabilis* 5628 and *P. mirabilis* KP and in the presence of the *L. gasseri* strain, the crystallization of urine components was inhibited (Figure 5). After 8 h of the experiment, no struvite crystals, with an X-shaped dendrite appearance, were observed in the cultures of *P. mirabilis* KP and 5628 in the presence of extracellular substances secreted by *L. gasseri*. Additionally, in the sample with *P. mirabilis* K8/MC and in the presence of *L. jensenii* and *L. gasseri*, the size of struvite crystals was smaller compared to that found in the controls. After 6 h of incubation there were no struvite crystals observed, and after 24 h, struvite and apatite crystals were detected in each sample, therefore the attention was focused on images after 8 h of incubation. Apatite was formed in all samples probably because it crystallizes at a lower pH than struvite.

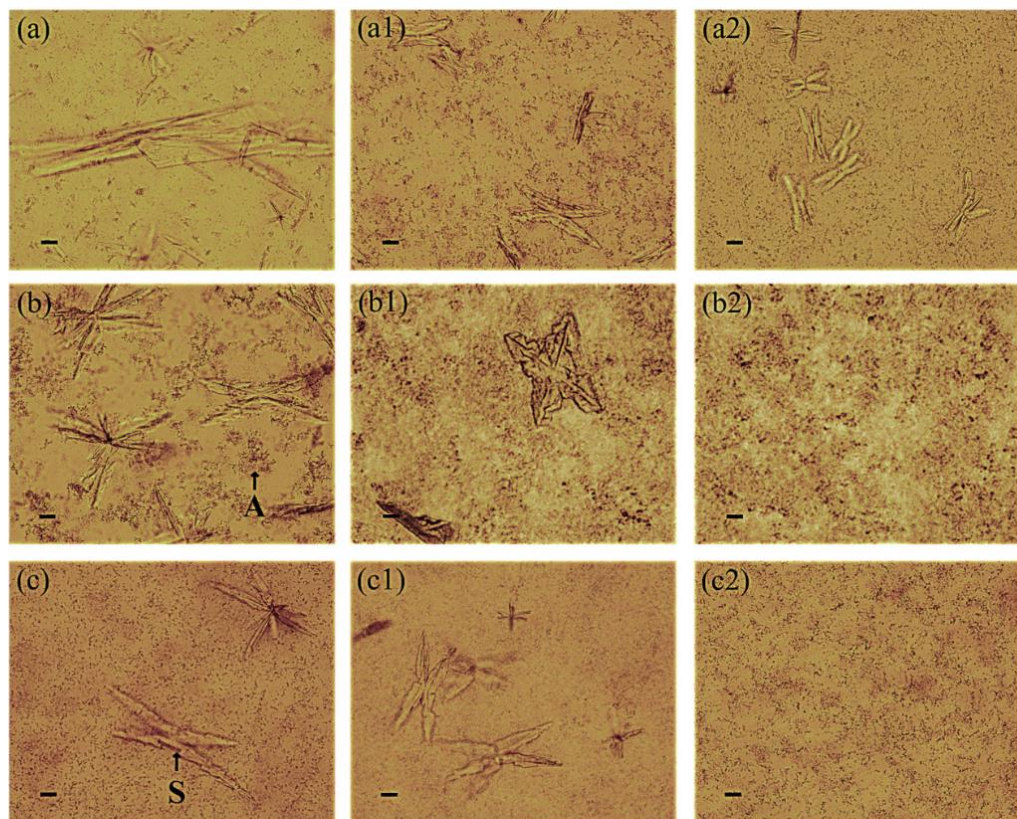


Figure 5. Crystallization caused by *P. mirabilis* ((a) *P. mirabilis* K8/MC; (b) *P. mirabilis* KP; (c) *P. mirabilis* 5628) in the presence of the extracellular substances secreted by *L. jensenii* (1) and *L. gasseri* (2) after 8 h of incubation. The scale bar represents 10 μm . A corresponds to carbonate apatite and S to struvite crystals.

The intensity of crystallization associated with the epithelium was determined on the basis of the concentration of calcium and magnesium ions, release of ammonia and visualization of crystallization using Von Kossa staining and confocal microscopy. As shown in Figure 6, in the presence of *L. gasseri*, the content of Ca^{2+} ions was significantly lower compared to the controls after 6 or 8 h of incubation. However, the concentration of magnesium in the samples incubated with *Lactobacillus* strains was unexpectedly higher compared to the controls (by up to 20%, * $p < 0.05$). Both *Lactobacillus* strains inhibited

ammonia release in the co-culture with all *Proteus* strains. The strongest inhibition of ammonia release (by 27%) was observed in the presence of *L. gasseri* and *P. mirabilis* 5628 after 6 h of incubation (** $p < 0.03$).

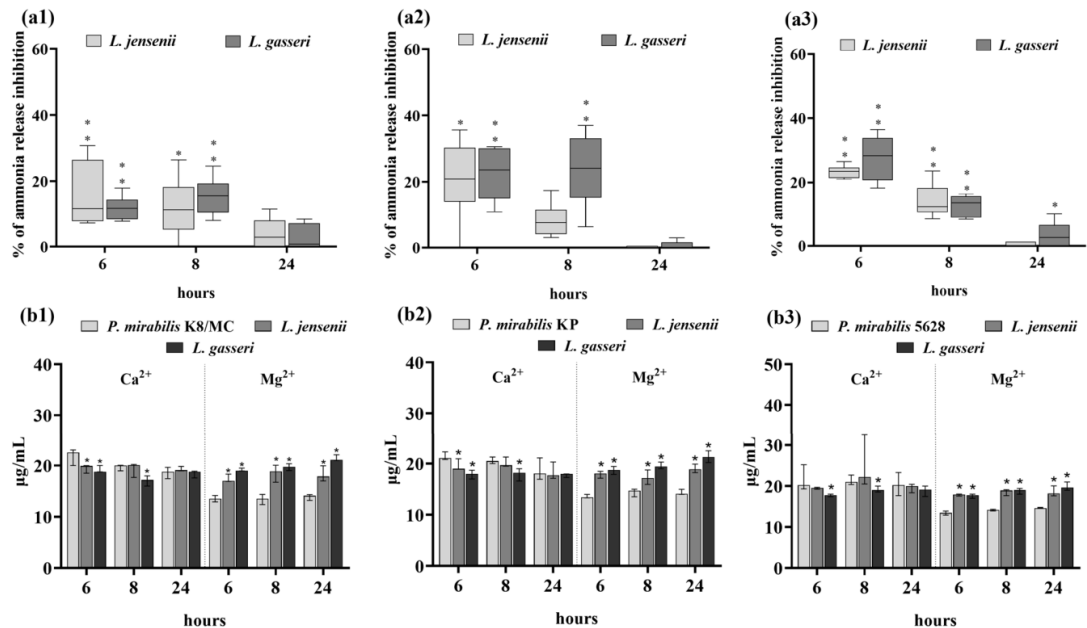


Figure 6. Percentage of ammonia release inhibition in the culture with the *P. mirabilis* strains and the HCV-29 cell line in RPMI medium with synthetic urine and the extracellular substances secreted by *Lactobacillus* after 6, 8 and 24 h of incubation (a). Intensity of crystallization expressed as the concentration of Mg^{2+} and Ca^{2+} in the culture with the *P. mirabilis* strains and the HCV-29 cell line in RPMI medium with synthetic urine and the extracellular substances secreted by *Lactobacillus* after 6, 8 and 24 h of incubation (b). (1) corresponds to *P. mirabilis* K8/MC, (2) to *P. mirabilis* KP and (3) to *P. mirabilis* 5628. The results are presented as median $\pm$ interquartile range (IQR) of three experiments. ** $p < 0.03$, * $p < 0.05$ for comparison of ammonia release in pure culture vs. in the presence of *Lactobacillus* extracellular substances using Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparisons, and for comparison of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions concentrations in pure culture vs. in the presence of *Lactobacillus* extracellular substances using Mann–Whitney U test.

Von Kossa staining was performed to visualize calcium deposits associated with the HCV-29 cells. Calcium is the main component of carbonate-apatite crystals and, as shown in Figure 7, apatite crystals may be formed and remain in the epithelial cells of the bladder and outside the cells. Calcium deposits (black points) inside and outside the cells were observed in all control samples and in some samples with the *Lactobacillus* strains, which proved the ongoing crystallization process. However, no deposits were observed in the presence of the metabolic products of the *L. gasseri* strain and *P. mirabilis* 5628.

Images from confocal microscopy allowed for visualization of eukaryotic and bacterial cells, stained by a green fluorescent dye, and crystals showing autofluorescence. The impact of the substances secreted by *Lactobacillus* on crystallization caused by the *P. mirabilis* strains was investigated; however, in confocal microscopy, the attention was focused on *P. mirabilis* 5628 in a co-culture with *L. gasseri*, where the intensity of crystallization was inhibited the most intensively. As shown in Figure 8, autofluorescent crystals (red points) were most noticeable in the control sample with *P. mirabilis* 5628, inside the eukaryotic cells (Figure 8a). There were no reflecting crystals in the presence of the substances secreted by *L. jensenii*

(Figure 8b) and *L. gasseri* (Figure 8c). Additionally, it could be observed that in the presence of the *Lactobacillus* extracellular substances, especially substances of *L. gasseri*, eukaryotic cells looked healthier compared to control, which proves the inhibition of the cytotoxic effect of *Proteus*.

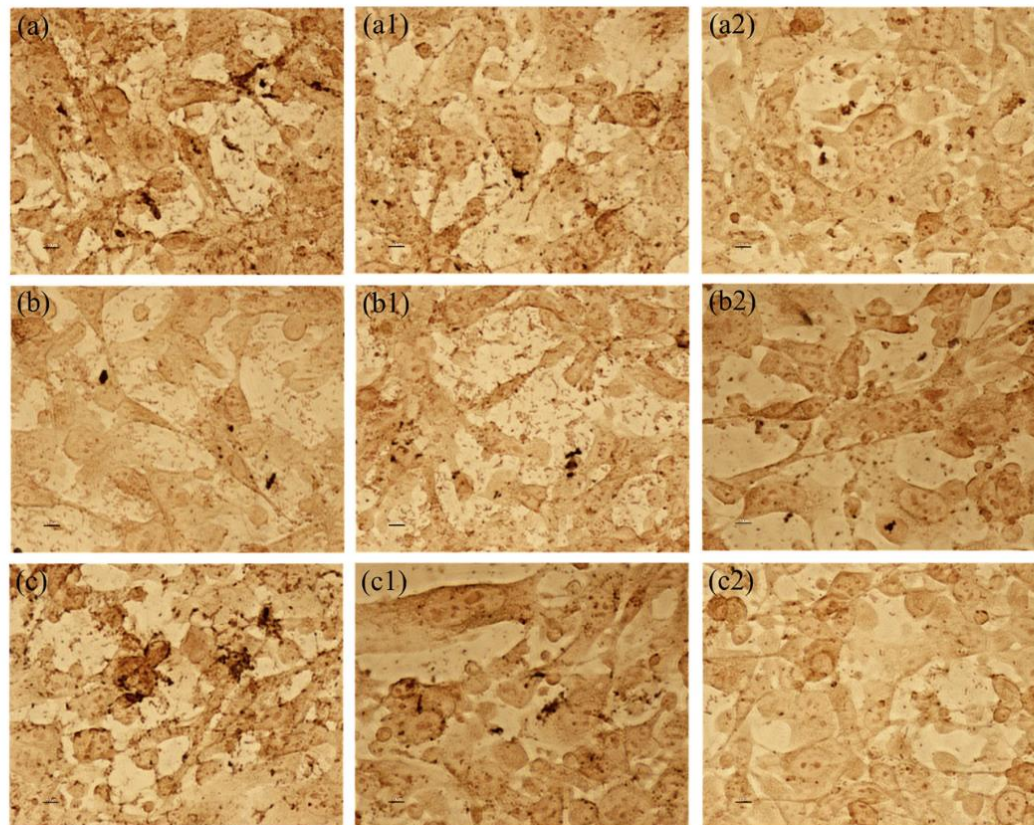


Figure 7. Crystallization caused by *P. mirabilis* ((a) *P. mirabilis* K8/MC; (b) *P. mirabilis* KP; (c) *P. mirabilis* 5628) in the presence of extracellular substances secreted by *L. jensenii* (1) and *L. gasseri* (2). The scale bar represents 10 μ m.

In our previous studies, we had shown that organic acids secreted by the tested *Lactobacillus* strains had antibacterial properties [17] and L-lactic acid was able to inhibit the activity of urease, an enzyme secreted by *Proteus* strains involved in the crystallization process [18]. The two main organic acids secreted by the tested strains of *L. gasseri* and *L. jensenii* are lactic acid and succinic acid; therefore, in this work the attention was focused on the secretion of these two acids. The results of this study indicate that *L. gasseri* and their extracellular substances can inhibit the crystallization process and the cytotoxicity of bladder cells induced by *P. mirabilis* and have the ability to inhibit the adhesion of these uropathogens to the epithelium. Simultaneously, this strain produces a higher concentration of L-lactic acid compared to *L. jensenii* (Figure 9). Interestingly, *L. jensenii* may be distinguished by the secretion of a high concentration of succinic acid, and both strains produce similar level of D-lactic acid. These results indicate that L-lactic acid may be responsible for the anti-adhesive, anti-crystallization or anti-cytotoxic properties.

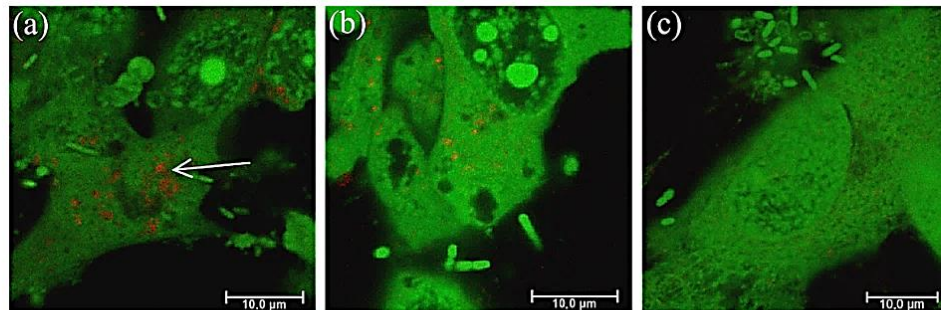


Figure 8. Confocal laser scanning microscopy images. The HCV-29 cell line and the *P. mirabilis* 5628 cells were stained with SYTO-13 and are green, while the crystals show autofluorescence and are red (white arrow). (a) corresponds to control, (b) corresponds to extracellular substances of *L. jensenii* and (c) to *L. gasseri*. The scale bar represents 10 μ m.

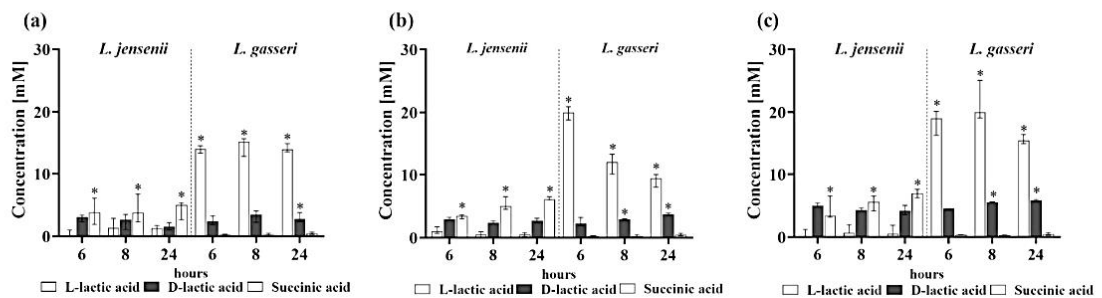


Figure 9. Concentrations [mM] of L-lactic, D-lactic and succinic acids after 6, 8 and 24 h of incubation with *P. mirabilis* strains ((a) K8/MC, (b) KP, (c) 5628) and in the presence of *L. jensenii* and *L. gasseri* using the cell culture inserts system. The results are presented as median $\pm$ interquartile range (IQR) of four experiments. * $p < 0.05$ for the comparison of concentration of organic acids in the tested supernatants in the presence of *L. jensenii* vs. in the presence of *L. gasseri* according to Mann-Whitney U test.

3. Discussion

Infectious urolithiasis is one of the subsets of urolithiasis characterized by a high rate of morbidity and mortality, constituting a global health-care issue. Struvite stones are formed rapidly within 4–6 weeks, treatment of this disease is often ineffective and relapses are very common [19,20]. According to the research of Wong. et al. [21], after a complete eradication of a urinary stone, recurrences were observed at the level of 10%; however, if fragments of the stone remained in the urinary tract, the recurrence rate increased to 85%. Moreover, difficulties in the treatment can be also associated with the fact that bacteria can hide in the interstices of the stone or exist within eukaryotic cells, which reduces the effectiveness of antibiotic therapy [8,22]. All these facts make infectious urinary stones the most challenging to treat among all types of stones.

Urease-producing microorganisms, bacteria belonging to the genus *Proteus* in particular, are involved in the formation of urinary stones. Bichler et. al. [23] demonstrated that 100% of *Proteus* strains produce this enzyme and studies conducted by Kramer et al. [24] showed that 70% of urinary stone isolates were microorganisms belonging to this genus. In our previous studies, we had demonstrated that organic acids of the tested *Lactobacillus* strains had antibacterial properties against *P. mirabilis* [17] and lactic acid had an impact on urease activity [18]. Additionally, we showed that *Lactobacillus* inhibited crystallization in the co-culture with *P. mirabilis*. This knowledge led us to speculate that organic acids

secreted by *Lactobacillus* affected the crystallization process as well as the adhesion of the *Proteus* strains to the bladder epithelium in vitro and decreased cell cytotoxicity induced by these uropathogens.

The first stage of UTIs and development of urease-induced stones is the invasion of uropathogens and their adhesion to the epithelium. *P. mirabilis* uses many virulence factors to initiate the infection [25]. Ammonia produced by *P. mirabilis* also has a great impact on the adhesion of bacteria to the urothelium and its colonization. Ammonia damages the layers of glycosaminoglycan that cover the epithelium of the urinary tract [20]. Struvite and apatite crystals can be formed in the bladder as well as in the kidneys. Their aggregation leads to the formation of urinary stones, which may damage the epithelium. At the same time, these areas can serve as nucleation sites for the crystallization process [26]. The presented results indicate that the *L. gasseri* strain reduces the adhesion of the *P. mirabilis* strains to the bladder epithelium by secreting extracellular substances. There are many reports about the anti-adhesion properties among *Lactobacillus* species concerning their inhibitory effect on the adhesion of pathogens to the genital tract [27] or urinary tract [28]. There are several mechanisms that allow *Lactobacillus* to protect the epithelium against pathogens. Lactic acid bacteria secrete extracellular substances such as organic acids or bacteriocins, which have an antibacterial effect, secrete proteins that degrade carbohydrate receptors and have an ability to produce receptor analogs and biosurfactants. The inhibition of adhesion can occur by displacing pathogens from the epithelium cells and by competition with the pathogen for specific receptors [29].

In the course of experiments, the influence of the extracellular substances secreted by the tested *Lactobacillus* strains on the cytotoxic effect induced by *P. mirabilis* strains was investigated. As shown in this study, *L. gasseri* significantly inhibited eukaryotic cell death caused by all *P. mirabilis* strains tested. Similarly, the viability of the cells after 24 h of incubation was the highest in the presence of *L. gasseri* extracellular components. We suggest that these anti-adhesion and anti-cytotoxicity properties of the *L. gasseri* strain are the result of L-lactic acid action, due to that fact that it is the main organic acid produced by this strain with antibacterial and urease-inhibitor activity. Maudsdotter et al. [30] showed that lactic acid produced by *Lactobacillus* exhibited antibacterial properties against *Streptococcus pyogenes* and reduced cytotoxicity of pharyngeal epithelial cells. Lactic acid had an ability to degrade *S. pyogenes* lipoteichoic acid, which induced host cell cytotoxicity. Therefore, it can be assumed that, in addition to the mechanisms indicated by our work, this process may be also influenced by others, operating simultaneously.

In our previous paper, we had revealed that *Lactobacillus* might inhibit the crystallization process caused by *P. mirabilis* with different intensity [18]. In this work, we focused on two *Lactobacillus* strains that showed the strongest and the weakest ability of crystallization inhibition. Additionally, to confirm the fact that extracellular components are responsible for those properties, a system with inserts was used, which allowed diffusion of *Lactobacillus* metabolic products without mixing the *Proteus* and *Lactobacillus* cells. In the current research, we observed that the substances produced by *L. gasseri* significantly reduced the release of ammonia, and lower concentrations of Mg^{2+} and Ca^{2+} ions indicated the inhibition of the crystallization process. *L. jensenii* also exhibited such properties but to a lesser extent. The characteristic appearance of X-shaped struvite crystals formed due to the rapid increase in the pH value was also confirmed by phase contrast microscopy [31]. Similar results were obtained in the assay of crystallization associated with the epithelium. *Lactobacillus* strains, especially *L. gasseri*, inhibited the release of ammonia and calcium concentration. However, the Mg^{2+} ions concentration was different from that observed during the crystallization without the epithelium. In the presence of *Lactobacillus* strains, the content of Mg^{2+} ions were higher compared to the control. However, this was not due to the increased intensity of struvite crystallization but to the presence of a larger number of epithelial cells compared to the control system. A higher cell number was associated with reduced cytotoxicity of the bacteria. The estimated level of intracellular magnesium is 15–20 mM [32], while the level of calcium is approximately 0.1–0.5 μ M [33]; hence, in the experiments in the presence

of the epithelium, the level of cellular magnesium but not calcium might have interfered with the assessment of intensity of crystallization. Microscopic observations confirmed the inhibitory effect of the substances secreted by *Lactobacillus* on the crystallization induced by *P. mirabilis*. The reduced intracellular calcium content in the presence of *L. gasseri* was confirmed using Von Kossa staining and confocal microscopy images. There is not much data concerning the autofluorescence of urinary crystals. However, Mathoera et al. [34] visualized this phenomenon as well as intracellular crystallization in the ureter cell line SV-HUC-1. Also, Lin et al. [35] proved that calcium oxalate dehydrates, uric acid and calcium oxalate monohydrate crystals showed autofluorescence.

The *Lactobacillus* strains differ in their antibacterial properties, as shown by the research conducted by Hutt et al. [36], where *L. crispatus* were found to have a stronger antagonistic effect against *E. coli* and *Candida* than *L. jensenii* and *L. gasseri*. The concentration and type of secreted organic acids may also depend on the species of the microorganisms, culture medium and conditions [37]. Our study revealed that the tested *Lactobacillus* strains differed in terms of the production of organic acids in synthetic urine environment. *L. jensenii* was found to secrete large amounts of succinic acid, while *L. gasseri* produced L-lactic acid. Lactic acid exists in two enantiomers; L-lactic acid is an endogenous compound and D-lactic acid is characterized by harmful properties. D-lactic acid is a toxic metabolite, which in large doses may cause various health complications and has neurotoxic effects on organisms. Under normal conditions, concentration of this acid in the human body is controlled. However, this acid may be overproduced by microbiota in short bowel syndrome and after jejunioileal bypass surgery [38]. *Lactobacillus* strains generally produce both D-lactate and L-lactate, which was confirmed by our research as well. However, the level of concentrations may be different among *Lactobacillus* species, like in the study conducted by Witkin et al. [39] where the level of D-lactic acid in the samples containing *L. crispatus* was higher than in those with *L. iners*.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains

The *P. mirabilis* strains (KP; 5628) were isolated at the Department of Microbiology from the urine of patients of the Children's Memorial Health Institute in Warsaw, Poland, who had been diagnosed with infectious urolithiasis. The *P. mirabilis* K8/MC strain was obtained from urinary stones and provided by the Provincial Specialist Hospital M. Pirogow in Lodz. The strains were identified using the API 20E test (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France) and cultured on TSB (tryptic soy broth, BTL, Warsaw, Poland) at 37 °C for 24 h.

Lactobacillus strains were isolated from the urinary tract of healthy people with the consent of the Committee for Bioethics of Scientific Research of the University of Lodz (4(I)/KBBN-UŁ/II/2020), and were deposited in the bacterial strain collection at the Department of Biology of Bacteria, University of Lodz. The method of isolation of these strains and their characteristics had been described previously [17]. Briefly, the strains were obtained from human urine of both men and women who had not been treated with antibiotics and probiotics in the last 3 months. They were identified by their morphology and mass spectrometry using a MALDI/TOF Microflex LT (Bruker, Billerica, MA, USA). *Lactobacillus* spp. were cultured on APT broth (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) and incubated in 5% CO₂ at 37 °C for 48 h.

4.2. Adhesion Assay

The effect of extracellular substances secreted by *Lactobacillus* strains on the adhesion of the tested *P. mirabilis* strains to the bladder epithelial cell line (HCV-29) was determined in this assay. The cells were grown in RPMI 1640 medium (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FBS, Biowest, Nuaille, France), 2 mM ultraglutamine (Lonza, Walkersville, MS, USA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (PolfaTarchomin, Warsaw, Poland). The assay was carried out on the adherent 12-well plates with polycarbonate membrane inserts with a pore diameter 0.4 µm

(ThermoFisher, Waltham, MA, USA), seeded with 1×10^5 cells per well. After 5 days of incubation in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C, RPMI medium without antibiotics and synthetic urine (in the ratio 4:1) were added. Synthetic urine contained the following components [g/L]: CaCl₂·2H₂O, 0.651; MgCl₂·6H₂O, 0.651; NaCl, 4.6; Na₂SO₄, 2.3; sodium citrate, 0.65; sodium oxalate, 0.02; KH₂PO₄, 2.8; KCl, 1.6; NH₄Cl, 1.0; urea, 25.0; creatinine, 1.1; tryptic soy broth, 10.0 (Sigma, St. Louis, MO, USA). It was prepared according to the previously described procedure [18,40]. The HCV-29 cell line was infected with bacterial cultures in the ratio 1:5 (it was determined that in this ratio, crystallization was most intensively inhibited by *Lactobacillus*) of *P. mirabilis* and *Lactobacillus*, cultured as described in Section 4.1. The control was pure *P. mirabilis* in the mixture of RPMI and synthetic urine. A bacterial culture of *P. mirabilis* was added to the lower part of the plate and that of *Lactobacillus* to the insert, which ensured the diffusion of metabolic products of *Lactobacillus* while simultaneously preventing the mixing of *Proteus* and *Lactobacillus* cells. After 1 h of incubation, the cells were washed two times with PBS to remove non-adherent bacteria. To establish the number of adherent *P. mirabilis* bacteria, a monolayer was lysed using 1% Triton X-100. Serial dilutions were seeded on Tryptic Soy Agar (TSA, BTL, Warsaw, Poland) and incubated at 37 °C for 24 h and the results were presented as bacterial colony-forming units (CFU/mL). Additionally, in order to assess the adhesion of the *P. mirabilis* strains, the qualitative, crystal violet staining method was performed. In short, the cells were seeded 1×10^5 per well and incubated for 24 h. Subsequently, 4% formaldehyde was added to the wells for 10 s to fix the cells. Then, after washing with PBS solution, 1% crystal violet aqueous solution was added to each well containing epithelial cells with adherent *P. mirabilis* strains and stained for 5 min. After incubation and washing with distilled water, adhesion was observed using a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TE-2000-S, Tokyo, Japan).

4.3. In Vitro Cytotoxicity Studies

The influence of *Lactobacillus* extracellular substances on the cytotoxic effect of HCV-29 cells induced by *P. mirabilis* was determined using the MTT and lactate dehydrogenase activity (LDH) assays. The MTT assay was performed according to Toniolo G. et al. [41]. Briefly, HCV-29 cells (1×10^5 cells/per well) were cultured in a 12-well plate for 5 days and infected with *P. mirabilis* and *Lactobacillus* strains as described in Section 4.2. After 24 h of incubation, using the cell culture inserts system, the bacterial cultures were removed and washed two times with PBS solution. Subsequently, 40 µL of MTT solution (5 mg/mL in PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) and 400 µL of RPMI 1640 medium without antibiotics were added to the wells. The cells were incubated under the same conditions for 3 h. The solution was then removed and the formed formazan crystals were dissolved in DMSO and glycine buffer (12.5 mL 0.2 M glycine; 10.9 mL 0.2 M NaOH; 26.6 mL H₂O). The absorbance was measured on a 96-well plate at 550 nm wavelength using a Multiskan Ex microplate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). The results were expressed as a percentage of cell viability, where the positive control was an untreated monolayer of the cell line HCV-29 and the negative control was a monolayer of the cell line infected with the *P. mirabilis* strains.

To measure the level of cell death, the HCV-29 cell line was cultured and infected as described above. The LDH assay was performed using the LDH assay kit (Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. In brief, after 24 h, the culture supernatants were collected and transferred to a 96-well plate. Subsequently, 100 µL of the reaction mixture was added and incubated for 30 min and 50 µL of a stop solution was added to each well. The absorbance was measured at 490 nm and 625 nm wavelengths. The results were expressed as a percentage of cell death, where 100% was the monolayer infected with *P. mirabilis* strains.

4.4. Crystallization Assay

The crystallization assay was performed on 12-well plates with polycarbonate membrane inserts with a pore diameter 0.4 µm to assess the influence of extracellular substances

of *Lactobacillus* on the crystallization caused by *P. mirabilis* over time. A total of 2 mL of synthetic urine and the cultures of *P. mirabilis* and *Lactobacillus* were added as described in Section 4.2. Pure *P. mirabilis* cultures in synthetic urine were controls in this experiment. The plate was incubated at 37 °C and at 6, 8 and 24 h of incubation the samples were analyzed to evaluate the intensity of crystallization. Ca^{2+} and Mg^{2+} ion concentrations were determined by the atomic absorption spectroscopy method with flame atomization (240FS AA Agilent, Santa Clara, CA, USA). Samples for this analysis were prepared by collecting the supernatants at the tested hours (0.5 mL) and additionally by adding 0.5 mL of 65% HNO_3 to the emptied wells for mineralization of the residue. Ammonia release in the tested samples was measured by the phenol hypochlorite colorimetric method [42], and the results were expressed as a percentage of the inhibition of ammonia release, where 100% was the concentration of ammonia in the control, synthetic urine with *P. mirabilis*. Qualitative analysis of the degree of crystallization consisted of the observation of struvite and apatite crystals using a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TE-2000-S, Tokyo, Japan). Moreover, at 6, 8 and 24 h, supernatants were collected and the concentrations of L-lactic acid, D-lactic acid and succinic acid were determined, following the manufacturer's instructions, using D-lactate (MAK058), L-lactate (MAK329) and succinate (MAK335) assays kits (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA).

The evaluation of crystallization associated with the epithelium was performed analogously. The HCV-29 cell line was cultured and infected as described in Section 4.2. The plate was incubated at 37 °C and after 6, 8 and 24 h of incubation, the samples were analyzed to assess Ca^{2+} and Mg^{2+} and ammonia release at the same conditions as above.

4.5. Imaging of Cell-Associated Crystallization

Von Kossa staining was performed according to Akiyoshi et al. [43] with some modifications to detect and visualize calcium deposits in the tissue samples. The HCV-29 cell line (1×10^5 cells per well) was cultured at 37 °C for 24 h, 5% CO_2 on the surface of an adherent 12-well plate, and infected with *P. mirabilis* and *Lactobacillus* strains as described in Section 4.2. After 4 h of incubation, the monolayer was washed with distilled water and 5% silver nitrate was added to the wells. After 20 min of exposure to the UV lamp, the wells were washed with distilled water and treated with 5% sodium thiosulphate for 5 min. Subsequently, the monolayer was washed again and stained with 1% neutral red. The red-stained cells with black calcium deposits were observed using a phase contrast microscope (Nikon Eclipse TE2000-S, Tokyo, Japan).

A confocal laser scanning microscope (CLSM) was used to image crystallization using the phenomenon of crystal autofluorescence. The eukaryotic cells were cultured as described above, on an adherent black 12-well plate with a FLux bottom (SPL Life Sciences, Pochon, Republic of Korea) and infected with the *P. mirabilis* and *Lactobacillus* strains as described in Section 4.2. After 4 h of incubation, the monolayer was washed with PBS solution and incubated with 4% of formaldehyde solution for 15 min to fix the cells. Then, after washing the wells twice with PBS, the green fluorescent nucleic acid dye SYTO13 (1:1000 dilution in PBS, Thermofisher, Waltham, MA, USA) was added and the culture was incubated in the dark for 20 min. After incubation, the cells were washed once again with PBS and suspended in 250 μL of PBS solution. The imaging was performed using a Leica TCS SP8 (Wetzlar, Germany), LAS-AF Version 3.3.0 software with a DMI6000 inverted microscope and a 63 $\times$ magnification and oil immersion objective (HCL APO), HyD, in standard mode. SYTO13 was excited at 488 nm (laser intensity 5%) and 594 nm was used to visualize the autofluorescence of crystals (laser intensity 30%) [35]. Confocal scanning was performed bidirectionally at 400 Hz and the line average was set to 4. Control and testing samples had the same parameters sets.

4.6. Statistical Analysis

All experiments were carried out at least in triplicate. The normal distribution was analyzed by the Kolmogorov–Smirnov test and homogeneity of variance was performed

by Levene's test. Statistical analyses were based on the non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparisons and the Mann–Whitney U test, performed using Statistica software version 13.3 (StatSoft, Krakow, Poland) and GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results were considered to be statistically significant at p value < 0.05 .

5. Conclusions

On the basis of the above results, it can be concluded that extracellular substances of *Lactobacillus* have an impact on the pathogenicity of *P. mirabilis* strains by inhibiting the adhesion to the epithelium, reducing cytotoxicity and the crystallization process. We indicated that L-lactic acid was responsible for such properties, which seems to confirm our previous research results [18]. Simultaneously, we cannot exclude that other molecules secreted extracellularly by *Lactobacillus*, and other mechanisms that will be the subject of our further work are also responsible for these effects. However, the results of this work may contribute to better treatment and prevention of urinary tract diseases, especially infectious urolithiasis.

Author Contributions: Conceptualization, A.T. and D.S.; methodology, D.S. and M.S.; investigation, D.S. and M.S.; writing—original draft preparation, D.S.; writing—review and editing, A.T.; visualization, D.S.; supervision, A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the University of Lodz Excellence Initiative—Research University (IDUB) competition (project number 7/DGB/IDUB/2022).

Institutional Review Board Statement: The study was approved on 30 March 2020, by the Committee for Bioethics of Scientific Research of the University of Lodz (4(I)/KBBN-UL/II/2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: Confocal microscopy was carried out at the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques of the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz. We would like to thank Magdalena Gapińska and Lucja Balcerzak for technical assistance in this stage of research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Armbruster, C.E.; Mobley, H.L.T. Merging mythology and morphology: The multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 743–754. [CrossRef] [PubMed]
2. Hamilton, A.L.; Kamm, M.A.; Ng, S.C.; Morrison, M. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00085–17. [CrossRef] [PubMed]
3. Yuan, F.; Huang, Z.; Yang, T.; Wang, G.; Li, P.; Yang, B.; Li, J. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Urol. Int.* **2021**, *105*, 354–361. [CrossRef] [PubMed]
4. Flores-Mireles, A.L.; Walker, J.N.; Caparon, M.; Hultgren, S.J. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 269–284. [CrossRef] [PubMed]
5. Nielubowicz, G.R.; Mobley, H.L.T. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **2010**, *7*, 430–441. [CrossRef]
6. Karki, N.; Leslie, S.W. Struvite and Triple Phosphate Renal Calculi. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568783/> (accessed on 30 May 2023).
7. Wang, Z.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Deng, Q.; Liang, H. Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2021**, *48*, 149. [CrossRef]
8. Torzewska, A.; Budzyńska, A.; Białczak-Kokot, M.; Rózsalski, A. In vitro studies of epithelium-associated crystallization caused by uropathogens during urinary calculi development. *Microb. Pathog.* **2014**, *71*–72, 25–31. [CrossRef]
9. Marien, T.; Miller, N.L. Treatment of the Infected Stone. *Urol. Clin. N. Am.* **2015**, *42*, 459–472. [CrossRef]
10. Türk, C.; Petřík, A.; Sarica, K.; Seitz, C.; Skolarikos, A.; Straub, M.; Knoll, T. EAU Guidelines on Interventional Treatment for Urolithiasis. *Eur. Urol.* **2016**, *69*, 475–482. [CrossRef]

11. Whiteside, S.A.; Razvi, H.; Dave, S.; Reid, G.; Burton, J.P. The microbiome of the urinary tract—A role beyond infection. *Nat. Rev. Urol.* **2015**, *12*, 81–90. [\[CrossRef\]](#)
12. Putonti, C.; Shapiro, J.W.; Ene, A.; Tsibere, O.; Wolfe, A.J. Comparative Genomic Study of *Lactobacillus jensenii* and the Newly Defined *Lactobacillus mulieris* Species Identifies Species-Specific Functionality. *mSphere* **2020**, *5*, e00560-20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Lourenço, A.; Pedro, N.A.; Salazar, S.B.; Mira, N.P. Effect of Acetic Acid and Lactic Acid at Low pH in Growth and Azole Resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Gong, Z.; Luna, Y.; Yu, P.; Fan, H. Lactobacilli inactivate *Chlamydia trachomatis* through lactic acid but not H₂O₂. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107758. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Leccese Terraf, M.C.; Juarez Tomás, M.S.; Rault, L.; Le Loir, Y.; Even, S.; Nader-Macías, M.E.F. In vitro effect of vaginal lactobacilli on the growth and adhesion abilities of uropathogenic *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **2017**, *199*, 767–774. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Fotakis, G.; Timbrell, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **2006**, *160*, 171–177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Szczerbiec, D.; Piechocka, J.; Głowacki, R.; Torzewska, A. Organic Acids Secreted by *Lactobacillus* spp. Isolated from Urine and Their Antimicrobial Activity against Uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Molecules* **2022**, *27*, 5557. [\[CrossRef\]](#)
18. Szczerbiec, D.; Bednarska-Szczepaniak, K.; Torzewska, A. Department of Biology of Bacteria, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237, Lodz, Poland. 2023, *manuscript in revision*.
19. Espinosa-Ortiz, E.J.; Eisner, B.H.; Lange, D.; Gerlach, R. Current insights into the mechanisms and management of infection stones. *Nat. Rev. Urol.* **2019**, *16*, 35–53. [\[CrossRef\]](#)
20. Flannigan, R.; Choy, W.H.; Chew, B.; Lange, D. Renal struvite stones—Pathogenesis, microbiology, and management strategies. *Nat. Rev. Urol.* **2014**, *11*, 333–341. [\[CrossRef\]](#)
21. Wong, H.Y.; Riedl, C.R.; Griffith, D.P. *Kidney Stones: Medical and Surgical Management*; Co, F., Favus, M., Pak, C., Parks, J., Preminger, G., Eds.; Jaypee Brothers Medical Publishers: New Delhi, India, 1996; pp. 941–950.
22. Gettman, M.T.; Segura, J.W. Struvite stones: Diagnosis and current treatment concepts. *J. Endourol.* **1999**, *13*, 653–658. [\[CrossRef\]](#)
23. Bichler, K.H.; Eipper, E.; Naber, K.; Braun, V.; Zimmermann, R.; Lahme, S. Urinary infection stones. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2002**, *19*, 488–498. [\[CrossRef\]](#)
24. Kramer, G.; Klingler, H.C.; Steiner, G.E. Role of bacteria in the development of kidney stones. *Curr. Opin. Urol.* **2000**, *10*, 35–38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Klein, R.D.; Hultgren, S.J. Urinary tract infections: Microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 211–226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Li, H.; Yao, Q.Z.; Wang, Y.Y.; Li, Y.L.; Zhou, G.T. Biomimetic synthesis of struvite with biogenic morphology and implication for pathological biomineralization. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7718. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. He, Y.; Niu, X.; Wang, B.; Na, R.; Xiao, B.; Yang, H. Evaluation of the Inhibitory Effects of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* on the Adhesion of Seven Common Lower Genital Tract Infection-Causing Pathogens to Vaginal Epithelial Cells. *Front. Med.* **2020**, *7*, 284. [\[CrossRef\]](#)
28. Johnson, J.A.; Delaney, L.F.; Ojha, V.; Rudraraju, M.; Hintze, K.R.; Siddiqui, N.Y.; Sysoeva, T.A. Commensal Urinary Lactobacilli Inhibit Major Uropathogens In Vitro with Heterogeneity at Species and Strain Level. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 870603. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Jayashree, S.; Karthikeyan, R.; Nithyalakshmi, S.; Ranjani, J.; Gunasekaran, P.; Rajendhran, J. Anti-adhesion property of the potential probiotic strain *Lactobacillus fermentum* 8711 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 411. [\[CrossRef\]](#)
30. Maudsdotter, L.; Jonsson, H.; Roos, S.; Jonsson, A.B. Lactobacilli Reduce Cell Cytotoxicity Caused by *Streptococcus pyogenes* by Producing Lactic Acid That Degrades the Toxic Component Lipoteichoic Acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1622–1628. [\[CrossRef\]](#)
31. Manzoor, M.A.P.; Mujeeburahman, M.; Duwal, S.R.; Rekha, P.D. Investigation on growth and morphology of in vitro generated struvite crystals. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *17*, 566–570. [\[CrossRef\]](#)
32. Romani, A.M.P. Magnesium in health and disease. *Met. Ions Life Sci.* **2013**, *13*, 49–79. [\[CrossRef\]](#)
33. Bagur, R.; Hajnóczky, G. Intracellular Ca²⁺ sensing: Role in calcium homeostasis and signaling. *Mol. Cell.* **2017**, *66*, 780–788. [\[CrossRef\]](#)
34. Mathoera, R.B.; Kok, D.J.; Verduin, C.M.; Nijman, R.J.M. Pathological and Therapeutic Significance of Cellular Invasion by *Proteus mirabilis* in an Enterocystoplasty Infection Stone Model. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 7022–7032. [\[CrossRef\]](#)
35. Lin, S.-L.; Chung, C.-Y.; Chen, Z.-T.; Huang, C.-C.; Li, Y.-Z.; Huang, E.Y.-H.; Chiang, H.K. Observation and identification of autofluorescent urine crystals may be linked to a sign of urolithiasis. *Urolithiasis* **2022**, *50*, 535–543. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Hütt, P.; Lapp, E.; Štěpetova, J.; Smidt, I.; Taelma, H.; Borovkova, N.; Oopkaup, H.; Ahelik, A.; Rööp, T.; Hoidmets, D.; et al. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2016**, *27*, 30484. [\[CrossRef\]](#)
37. Punia Bangar, S.; Suri, S.; Trif, M.; Ozogul, F. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Biosci.* **2022**, *46*, 101615. [\[CrossRef\]](#)
38. Pohanka, M. D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection. *Biomed Res. Int.* **2020**, *2020*, 3419034. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

39. Witkin, S.S.; Mendes-Soares, H.; Linhares, I.M.; Jayaram, A.; Ledger, W.J.; Forney, L.J. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: Implications for protection against upper genital tract infections. *mBio* **2013**, *4*, 10–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Griffith, D.P.; Musher, D.M.; Itin, C. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. *Investig. Urol.* **1976**, *13*, 346–350.
41. Toniolo, G.; Efthimiadou, E.K.; Kordas, G.; Chatgililoglu, C. Development of multi-layered and multi-sensitive polymeric nanocontainers for cancer therapy: In vitro evaluation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14704. [[CrossRef](#)]
42. Weatherburn, M.W. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 971–974. [[CrossRef](#)]
43. Akiyoshi, T.; Ota, H.; Iijima, K.; Son, B.-K.; Kahyo, T.; Setou, M.; Ogawa, S.; Ouchi, Y.; Akishita, M. A novel organ culture model of aorta for vascular calcification. *Atherosclerosis* **2016**, *244*, 51–58. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

IV. Wyniki nieopublikowane

IV.1. Materiały i metody

IV.1.1. Otrzymywanie supernatantów pochodzących z hodowli *Lactobacillus*

Badane szczepy *L. jensenii* oraz *L. gasseri* wyizolowane z dróg moczowych zdrowych ludzi, były hodowane na pożywce płynnej APT (BD Difco) w 37 °C przez 48 godzin w inkubatorze z zawartością 5% CO₂. Następnie hodowle bakteryjne były wirowane (3300 × *g*, 30 min, 4 °C). Otrzymane supernatanty były filtrowane przez filtr o średnicy porów 0,22 μm (Sartorius).

IV.1.2. Izolacja zewnątrzkomórkowych białek oraz polisacharydów *Lactobacillus*

Izolację polisacharydów przeprowadzono w oparciu o metodę Kwon i in. [139]. W celu izolacji polisacharydów z supernatantów *Lactobacillus*, których otrzymywanie opisano w rozdziale IV.1.1., dodawano 15% kwas trichlorooctowy (v/v), a następnie inkubowano próby 1 godzinę w 37 °C. W kolejnym etapie próby wirowano (10,000 × *g*, 10 min, 4 °C) i dodawano 96% etanol na lodzie w stosunku 1:2, w celu wytrącenia polisacharydów *Lactobacillus*. Próby inkubowano 24 godziny w 4 °C i po tym czasie ponownie wirowano (10,000 × *g*, 20 min, 4 °C). Powstały osad rozcieńczano w wodzie destylowanej.

Izolację białek przeprowadzono metodą z użyciem siarczanu amonu [140]. Supernatanty pochodzące z hodowli *L. jensenii* i *L. gasseri* otrzymywano w tych samych warunkach jak w przypadku izolacji cukrów. Do uzyskanych supernatantów dodawano siarczan amonu (80% nasycenia) i inkubowano przez noc w 4 °C. Następnie próby odwirowano (10,000 × *g*, 20 min, 4 °C) a powstały osad rozpuszczono w PBS.

Uzyskane próby polisacharydów oraz białek dializowano odpowiednio, wobec wody destylowanej oraz wobec PBS, przez 4 dni w temperaturze 4 °C. Zawartość cukrów oznaczono metodą Dubois [141] a białek, metodą Lowry'ego [142]. Próby następnie liofilizowano przez noc (FreeZone Plus 6, Labconco).

IV.1.3. Otrzymywanie kryształów struwitu

Mocz syntetyczny sporządzono według Griffith i in. [143] z pewnymi modyfikacjami. Mocz zawierał [g/l]: $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,651; NaCl, 4,6; Na_2SO_4 , 2,3; cytrynian sodu 0,65; szczawian sodu 0,02; KH_2PO_4 , 2,8; KCl, 1,6; NH_4Cl , 1,0; mocznik 25,0; kreatynina, 1,1 oraz TSB, 10,0 (Sigma). Do moczu syntetycznego nie dodawano jonów wapnia, ponieważ na tym etapie badań oceniano jedynie agregację kryształów struwitu. Otrzymany mocz sterylizowano za pomocą filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,2 μm (Sartorius).

Mocz syntetyczny doprowadzano do pH 8,5, za pomocą 1,2 M NH_3 , w ściśle kontrolowanych warunkach. Amoniak był dodawany do moczu w ilości około 8 μl /1 min, co umożliwiało uzyskanie małych kryształów struwitu. W celu otrzymania jednorodnych kryształów mocz syntetyczny był dodatkowo mieszany (100 obr/min), z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego w stałej temperaturze 37 °C (Edmund Bühler).

Dodatkowo, sporządzono również roztwór moczu syntetycznego bez kryształów struwitu. W tym celu do moczu syntetycznego dodawano 1,2 M NH_3 do pH 8,5, bez mieszania, natomiast nadal w stałej temperaturze 37 °C. Następnie otrzymany roztwór wirowano ($3300 \times g$, 20 min). Osad zebrano, a supernatant wykorzystywano do dalszych etapów badań. Tak przygotowany roztwór syntetycznego moczu stanowił rozpuszczalnik kryształów struwitu, a sposób jego przygotowania nie dopuszczał do dalszego wzrostu kryształów w trakcie trwania doświadczenia.

IV.1.4. Pomiar potencjału zeta kryształów struwitu

Agregację kryształów regulują ładunki powierzchniowe, które określić można za pomocą potencjału zeta. Próby do pomiaru potencjału zeta stanowiły 4 ml moczu bez kryształów, 25 μl kryształów struwitu, których przygotowanie zostało opisane w Rozdziale IV.2.3. oraz zewnątrzkomórkowe białka i cukry otrzymane z supernatantów pochodzących szczepów *L. jensenii* i *L. gasseri*, których izolacja została opisana w Rozdziale IV.2.2. Białka oraz polisacharydy dodawano w takim samym stężeniu jakie wytwarzały szczepy *Lactobacillus* do podłoża. Do prób dodawano 100 $\mu\text{g/ml}$ cukrów wyizolowanych z *L. jensenii* i *L. gasseri* oraz 6,5 mg/ml białek *L. jensenii* i 5 mg/ml *L. gasseri*. Kontrolę stanowiła próba bez białek oraz polisacharydów. Tak otrzymane

próby przed dodaniem do celek (A.P. Instruments) były poddane sonifikacji w łaźni wodnej z ultradźwiękami przez 3 minuty, w celu zapewnienia odpowiedniego rozproszenia cząstek. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w stałej temperaturze 37 °C oraz pH 8,5. Potencjał zeta mierzono za pomocą aparatu Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments). Parametry ustawiono na temperaturę 37 °C oraz pH wynoszące 8,5. Wykonano trzy niezależne pomiary tego doświadczenia.

IV.1.5. Ocena pola powierzchni agregatów struwitu

Wpływ białek oraz cukrów *Lactobacillus* na agregację kryształów struwitu oceniano również za pomocą obserwacji pod mikroskopem Olympus IX50. Na płytki ze szklanym dnem (Greiner) dodawano 990 µl moczu bez kryształów, 10 µl kryształów struwitu, których przygotowanie opisano w Rozdziale IV.2.3 oraz wyizolowane białka oraz cukry *Lactobacillus*, których izolacje opisano w Rozdziale IV.2.2. Kontrolę stanowiła próba bez dodatku białek oraz cukrów *Lactobacillus*. Obserwacje wykonywano niezwłocznie po naniesieniu prób na płytki. Pola powierzchni obserwowanych agregatów zliczano z 24 zdjęć pola widzenia mikroskopu, za pomocą oprogramowania Olympus cellSens Standard.

IV.1.6. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono w oparciu o test t-studenta oraz test Kruskala-Wallisa. Przeprowadzono również analizę korelacji pomiędzy wynikami potencjału zeta a polami powierzchni agregatów. Do analizy statystycznej użyto oprogramowania TIBCO Software Inc. (2017) Statistica wersja 13. Wyniki uznano za istotnie statystycznie przy wartości $p < 0.05$. Do wizualizacji wyników wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism w wersji 8 (GraphPad Software, USA).

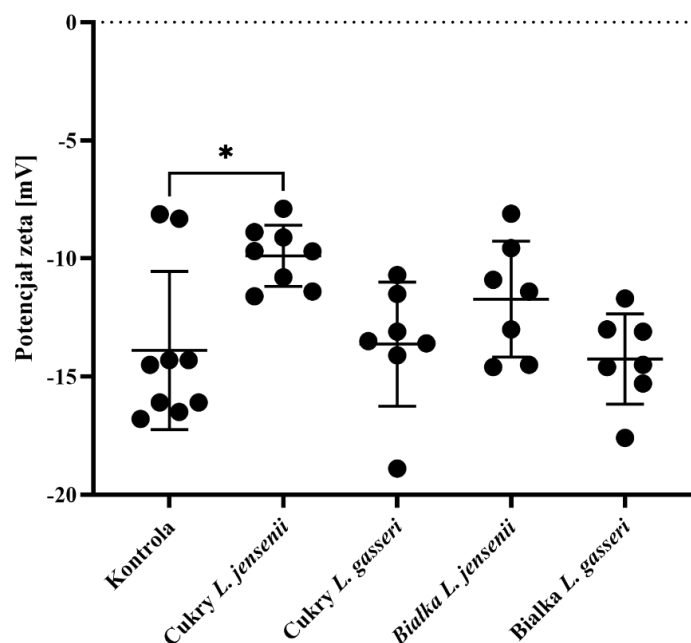
IV.2. Wyniki

IV.2.1. Wpływ zewnątrzkomórkowych białek oraz polisacharydów *Lactobacillus* na potencjał zeta kryształów struwitu

Na agregację kryształów struwitu ma wpływ ładunek powierzchniowy i siły odpychania elektrostatycznego pomiędzy kryształami. Pomiar potencjału zeta umożliwia ich oznaczenie. Na jego wartość wpływa wiele czynników, m.in. temperatura oraz wartość pH, dlatego też, te wartości w badanych próbach podczas doświadczenia, były stale kontrolowane. Rycina 6 przedstawia wartości potencjału zeta otrzymane dla próby kontrolnej bez cukrów oraz białek *Lactobacillus* oraz dla prób badanych z wyizolowanymi cukrami i białkami *L. jensenii* i *L. gasseri*. Przyjmuje się, że im potencjał zeta bliższy wartości 0, tym większe agregaty tworzą się w badanej próbce. Wynika z tego, że w obecności polisacharydów *L. jensenii*, agregaty kryształów struwitu były istotnie większe w porównaniu do kontroli, moczu syntetycznego z zawieszonymi kryształami. Zeta potencjał dla próby z cukrami *L. jensenii* wynosił $-9,885 \text{ mV} \pm 1,03$, podczas gdy w kontroli, wartość ta wynosiła $-13,894 \text{ mV} \pm 2,5$ (Tabela 1). Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic pomiędzy wartościami potencjału zeta z użyciem białek badanych szczepów *Lactobacillus* oraz cukrów *L. gasseri* w porównaniu do kontroli.

Tabela 1. Średnie pola powierzchni agregatów kryształów struwitu oraz wartości potencjału zeta w próbach badanych, z wyizolowanymi cukrami lub białkami *Lactobacillus* oraz w próbach kontrolnych.

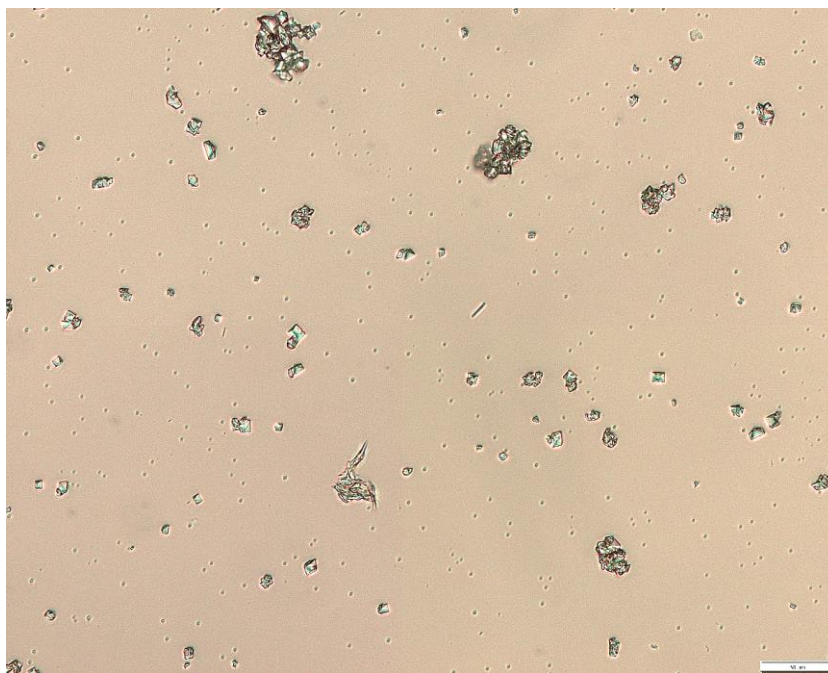
Próba	Średnie pole powierzchni [μm^2]	Potencjał zeta [mV]
Kontrola	$604,544 \pm 133$	$-13,894 \pm 2,5$
Cukry <i>L. jensenii</i>	$624,095 \pm 167$	$-9,885 \pm 1,03$
Cukry <i>L. gasseri</i>	$549,87 \pm 147$	$-13,629 \pm 1,64$
Białka <i>L. jensenii</i>	$677,40 \pm 202$	$-11,723 \pm 1,98$
Białka <i>L. gasseri</i>	$543,16 \pm 137$	$-14,257 \pm 1,42$



Rycina 6. Potencjał zeta agregatów kryształów struwitu [mV], w próbach badanych z wyizolowanymi cukrami oraz białkami *L. jensenii* i *L. gasseri* oraz w próbie kontrolnej. Wyniki przedstawione jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe z trzech eksperymentów. * $p < 0,05$ dla wartości potencjału zeta w próbie kontrolnej w porównaniu do próby badanej z cukrami lub białkami *Lactobacillus*, test Kruskala-Wallisa.

IV.2.2. Wielkość agregatów struwitu w obecności zewnątrzkomórkowych białek oraz polisacharydów *Lactobacillus*

Analizę agregacji w próbach badanych oraz kontroli prowadzono również za pomocą obserwacji mikroskopowej i zliczaniu pól powierzchni agregatów za pomocą oprogramowania Olympus cellSens Standard. Przykładowe zdjęcie dla próby z dodatkiem wyizolowanych białek *L. jensenii* 22.2 i widocznymi agregatami kryształów struwitu przedstawia Rycina 7. Analizy statystyczne wykazały dodatnią korelację pomiędzy wartościami potencjału zeta a średnimi polami powierzchni agregatów Tabela 1), co świadczy o tym, że wraz ze wzrostem potencjału zeta, rosło również pole powierzchni agregatu. Jednocześnie, nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy średnią wielkością agregatów w badanych układach a kontrolą. Mimo tego, warto podkreślić, że w obecności cukrów oraz białek *L. jensenii* agregaty były większe w porównaniu do kontroli, podczas gdy w obecności białek oraz cukrów *L. gasseri*, agregaty były mniejsze. Ten etap badań wymaga jednak dalszych analiz, które jasno wskażą rolę i wpływ białek oraz cukrów *Lactobacillus* na proces agregacji kryształów struwitu.



Rycina 7. Przykładowe zdjęcie agregatów struwitu dla próby z dodatkiem zewnątrzkomórkowych białek *L. jensenii*. Wskaźnik skali odpowiada długości 50 μm .

IV.3. Podsumowanie wyników stanowiących nieopublikowaną część pracy

Agregacja kryształów stanowi kluczowy etap powstawania infekcyjnych kamieni moczowych. Proces ten zachodzi bardzo szybko i zależy od wielu czynników jak temperatura, pH i obecności innych substancji chemicznych. W celu dopełnienia wiedzy na temat składników zewnątrzkomórkowych *Lactobacillus* i ich wpływu na agregację kryształów, przeprowadzono analizy wpływu białek oraz cukrów tych drobnoustrojów na ten proces. Według danych literaturowych, substancje te mogą wpływać na potencjał zeta, poprzez tworzenie bardziej hydrofilowej powierzchni komórek bakteryjnych, co wpływa na procesy agregacji oraz adhezji [144]. Ten mechanizm jest omawiany głównie pod kątem wpływu na procesy autoagregacji drobnoustrojów komensalnych oraz koagregacji *Lactobacillus* z patogenami [72,144]. Jak wykazały wyniki tej części pracy doświadczalnej, w obecności cukrów *L. jensenii* tworzą się większe agregaty struwitu w porównaniu do kontroli, bez dodatku substancji zewnątrzkomórkowych *Lactobacillus*. Jednakże, nie potwierdziły tego wyniki otrzymane ze średnich pól powierzchni agregatów. Ten etap wymaga dalszych badań, które przede wszystkim scharakteryzują zewnątrzkomórkowe białka oraz polisacharydy wydzielane przez *L. jensenii* oraz *L. gasseri* oraz mechanizm ich działania w kontekście ich wpływu na agregację kryształów. Warto podkreślić, że polisacharydy wykazują duże zróżnicowanie w składzie

chemicznym, co może mieć wpływ na procesy agregowania kryształów struwitu. Wyniki tej części pracy sugerują, że skład polisacharydów szczepów *L. jensenii* oraz *L. gasseri* różnią się od siebie, co wpływa na intensywność agregacji. Jak wskazuje literatura, rzeczywiście polisacharydy wytwarzane przez *Lactobacillus* mogą różnić się pod kątem składu cukrów, w zależności od warunków środowiskowych czy dostępności substratów. Badania Giordani i in. [75] wskazały, że badany szczep *L. crispatus* zawierał więcej D-mannozy i D-fukozy, z kolei szczep *L. gasseri* charakteryzował się większą zawartością D-glukozy. Jednakże, co istotne, były to szczepy *Lactobacillus* wyizolowane z dróg rodnych. Niewiele jest danych dotyczących białek oraz polisacharydów wytwarzanych przez szczepy *Lactobacillus* wyizolowanych z dróg moczowych.

V. Podsumowanie wyników i wnioski

W toku badań eksperymentalnych wyizolowano 9 szczepów *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* oraz *L. saermineri*), należących do naturalnej mikrobioty dróg moczowych. Powyższe szczepy, wykazywały działanie przeciwbakteryjne, hamując wzrost patogenów *P. mirabilis* z różną intensywnością. Supernatanty niczym nietraktowane wykazywały najsilniejsze właściwości antagonistyczne wobec szczepów *P. mirabilis*, co wskazuje na kwasy organiczne jako główne substancje wydzielane przez *Lactobacillus* o charakterze antybakteryjnym. Analiza profilu wytwarzanych kwasów organicznych wykazała, że wszystkie badane szczepy *Lactobacillus* wydzielają kwas mlekowy oraz bursztynowy. Zidentyfikowano również szczepy wytwarzające kwas cytrynowy (*L. crispatus* 13.2, *L. crispatus* 40 oraz *L. gasseri* ATCC 33323). Badane kwasy organiczne hamowały wzrost bakterii oraz tworzenie biofilmu badanych szczepów *P. mirabilis*. Wraz ze wzrostem stężenia użytego kwasu, te właściwości były silniejsze. Ponadto, wyniki wykazały, że mechanizm działania badanych kwasów organicznych w kontekście ich antybakteryjnych właściwości wobec *P. mirabilis*, polega na przenikaniu przez ich błonę i zakłócaniu funkcji komórek. Powyższe wyniki, zawarte w **publikacji 1**, wskazują, że kwasy organiczne wydzielane przez *Lactobacillus* mają potencjał w zapobieganiu i leczeniu ZUM oraz mogą mieć wpływ na choroby związane z infekcjami dróg moczowych, jak rozwój infekcyjnych kamieni moczowych.

Wybrane szczepy *Lactobacillus* (*L. crispatus* 1.2, *L. crispatus* 4, *L. jensenii* 22.2 oraz *L. gasseri* 35.3) hamowały krystalizację mineralnych składników moczu w obecności badanych szczepów *P. mirabilis*. Wskazywały na to niższe stężenia wapnia i magnezu, pierwiastków budujących kryształy apatytu i struwitu, w obecności szczepów *Lactobacillus*, w szczególności *L. gasseri* 35.3, w porównaniu do kontroli bez ich dodatku. Obserwacje pod mikroskopem kontrastowo-fazowym potwierdziły te wyniki. Kryształy struwitu i apatytu w obecności szczepów *Lactobacillus* były mniejsze niż te obserwowane w kontroli, bądź nie było ich wcale. Wartości pH, stężenia amoniaku oraz żywotności bakterii *P. mirabilis* w próbach w obecności szczepów *Lactobacillus*, również były niższe w porównaniu do kontroli. Spośród badanych szczepów *Lactobacillus*, *L. gasseri* 35.3 charakteryzował się najsilniejszymi zdolnościami

hamującymi krystalizację, w przeciwieństwie do szczepu *L. jensenii* 22.2. Wyniki tej części pracy, opublikowane w **publikacji 2**, dowodzą, że szczepy *Lactobacillus* mają predyspozycje do hamowania procesu krystalizacji składników moczu indukowanych szczepami *P. mirabilis* i ma to związek z ich właściwościami przeciwbakteryjnymi na co wskazuje spadek żywotności badanych uropatogenów.

Kolejny mechanizm związany z hamowaniem tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych powiązany jest z wpływem wytwarzanego przez szczepy *Lactobacillus* kwasu mlekowego na aktywność ureazy. Wyniki kinetyki reakcji enzymatycznej, opublikowane w **publikacji 2**, wykazały, że kwas mlekowy hamuje aktywność ureazy poprzez oddziaływania kompetycyjne z centrum aktywnym enzymu. Badania *in silico* potwierdziły te oddziaływania, a ponadto wykazały prawie dwukrotnie silniejsze oddziaływanie kwasu L-mlekowego z enzymem niż mocznik. Wyniki tej części pracy sugerują, że to składniki zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus*, głównie kwas mlekowy wpływa na proces krystalizacji, a hamowanie aktywności ureazy to jeden z mechanizmów ich działania na ten proces, który może zachodzić jednocześnie z pozostałymi, jak na przykład działaniem antybakteryjnym *Lactobacillus* wobec patogenów.

Do dalszej analizy wpływu substancji zewnątrzkomórkowych *Lactobacillus*, wybrano dwa szczepy, *L. gasseri* 35.3 oraz *L. jensenii* 22.2, różniące się od siebie zdolnością hamowania krystalizacji oraz działaniem przeciwbakteryjnym wobec badanych szczepów *P. mirabilis*. Wyniki opublikowane w **publikacji 3**, wykazały, że substancje wydzielane przez *L. gasseri* 35.3 hamują adhezję badanych szczepów *P. mirabilis* KP i 5628 do nabłonka pęcherza moczowego nawet do 70%. Dodatkowo, substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus*, głównie *L. gasseri* 35.3 hamują cytotoksyczność wobec komórek HCV-29, indukowaną szczepami *P. mirabilis*. Ponadto, mają one również wpływ na krystalizację składników moczu indukowaną szczepami *P. mirabilis*. *L. gasseri* 35.3 hamował ten proces intensywniej niż *L. jensenii* 22.2 zarówno w układzie bez nabłonka dróg moczowych jak i w obecności komórek pęcherza moczowego. W tym etapie badań dowiedziono, że *L. gasseri* 35.3 wyróżnia się wytwarzaniem wysokich stężeń kwasu L-mlekowego, który jak wykazano we wcześniejszych doświadczeniach ma właściwości hamujące aktywność ureazy.

W toku badań wykazano również, że składniki zewnątrzkomórkowe, głównie polisacharydy wytwarzane przez badany szczep *L. jensenii* 22.2 wpływają na proces

agregacji struwitu, czyli łączenia się małych kryształów struwitu w większe aglomeraty. Potencjał zeta kryształów struwitu w obecności cukrów *L. jensenii* wzrasta, powodując powstawanie większych agregatów kryształów struwitu w porównaniu do kontroli, bez dodatku polisacharydów tego szczepu.

Wnioski końcowe

1. Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus*, należące do naturalnej mikrobioty dróg moczowych mają wpływ na patogenność *P. mirabilis* poprzez działanie antybakteryjne, hamowanie tworzenia biofilmu do powierzchni abiotycznych, hamowanie adhezji oraz cytotoksyczności wobec komórek pęcherza moczowego.
2. Badane szczepy *Lactobacillus* hamują krystalizację składników moczu, co jest pierwszym etapem tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych. Dowiedziono, że za ten efekt odpowiadają substancje zewnątrzkomórkowe, głównie kwas L-mlekowy, a mechanizm związany jest z właściwościami antybakteryjnymi oraz hamowaniem aktywności ureazy.
3. Substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus* mają wpływ na agregację kryształów struwitu. Jak wykazały wyniki, polisacharydy szczepu *L. jensenii* mogą wzmacniać ten proces poprzez tworzenie większych agregatów.
4. W świetle powyższych wyników można uznać szczepy *Lactobacillus* oraz wytwarzany przez nie kwas L-mlekowy jako potencjalny środek mogący w przyszłości wspomagać leczenie ZUM oraz infekcyjnej kamicy moczowej lub być skutecznym środkiem prewencji tych chorób.

VI. Dyskusja

Zakażenie dróg moczowych to jedna z najczęstszych chorób zakaźnych występujących u ludzi, tuż po infekcjach górnych dróg oddechowych. Szacuje się, że ponad 50 % kobiet oraz 12 % mężczyzn zachoruje na ZUM chociaż raz w swoim życiu. [145,146]. Standardowo leczenie powikłanych jak i niepowikłanych ZUM jest leczeniem empirycznym i rozpoczyna się od antybiotykoterapii. Jednakże, warto podkreślić, że nieodpowiedzialne stosowanie antybiotyków prowadzi do pojawiania się szczepów opornych, a trend ten wzrasta z roku na rok. Dane literaturowe podkreślają, że obecnie nawet 10-80% uropatogenów jest opornych na fluorochinolony, 10-70% na cefalosporyny trzeciej generacji a 5-35% na karbapenemy [5]. Co więcej, stosowanie antybiotyków prowadzić może do dysbiozy składu urobiomu, co paradoksalnie pogłębia problem nawracających infekcji dróg moczowych. Nieskuteczna terapia bądź brak jakichkolwiek metod leczenia infekcji układu moczowego, może prowadzić do ciężkich powikłań zdrowotnych jak rozwój zapalenia gruczołu krokowego u mężczyzn, sepsa czy rozwój infekcyjnych kamieni moczowych [147,148]. Wskazuje się, że ze względu na wysoką aktywność ureazy szczepów *P. mirabilis*, są one jednym z najczęstszych patogenów związanych z powstawaniem infekcyjnych kamieni moczowych.

W rozwoju ZUM kluczową rolę odgrywa naturalna mikrobiota tego środowiska, która w ostatnim czasie stanowi temat badań wielu doniesień naukowych. Obecnie, skuteczne metody diagnostyczne umożliwiają izolację mikroorganizmów stanowiących komensalną mikrobiotę dróg moczowych co prowadzi do pogłębiania wiedzy na temat interakcji tych drobnoustrojów z patogenami. Jednakże wciąż brakuje informacji dotyczących wpływu naturalnej mikrobioty dróg moczowych na infekcje układu moczowego wywołane pałeczkami *P. mirabilis* oraz na powikłania, do których prowadzą, jak rozwój infekcyjnej kamicy moczowej. Dlatego też, w ramach pierwszego etapu niniejszej rozprawy doktorskiej, dokonano oceny właściwości antybakteryjnych szczepów *Lactobacillus* izolowanych z dróg moczowych wobec *P. mirabilis* oraz scharakteryzowano substancje wydzielane przez pałeczki kwasu mlekowego, jednocześnie określając ich mechanizm działania na uropatogenne *P. mirabilis* (Publikacja 1).

Szczepy *Lactobacillus* należące do gatunków *L. crispatus*, *L. saerimneri*, *L. gasseri* oraz *L. jensenii*, wyizolowane zostały z moczu zdrowych ludzi. Jak wskazują dane literaturowe, są to jedne z najczęściej izolowanych gatunków bakterii tego środowiska wśród rodzaju *Lactobacillus* [60,61]. Mimo wielu doniesień naukowych dotyczących działania przeciwbakteryjnego *Lactobacillus* wobec patogenów, większość prac naukowych dotyczy szczepów wyizolowanych z żywności lub dróg rodnych kobiet [149–151]. Właściwości przeciwbakteryjne *Lactobacillus* zostały już wykazane wobec uropatogennych szczepów *P. mirabilis* [152,153], niemniej jednak, nie dotyczą one mikrobioty komensalnej dróg moczowych i wskazuje na brak wystarczających informacji na temat interakcji między bakteriami w tym środowisku. Wyniki tej rozprawy doktorskiej wykazały, że badane szczepy *Lactobacillus* hamują wzrost szczepów *P. mirabilis*, izolowanych z kamieni moczowych lub z moczu ze współistniejącą kamicą. Głównymi substancjami zewnątrzkomórkowymi produkowanymi przez drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* są kwasy organiczne, nadtlenek wodoru oraz bakteriocyny [154]. W niniejszej pracy wykazano, że to głównie kwasy organiczne hamują wzrost badanych szczepów *Proteus*, a analizy chromatograficzne wskazały, że wszystkie badane szczepy produkują kwas mlekowy oraz bursztynowy, a jedynie kilka z nich kwas cytrynowy. Rodzaj wytwarzanego kwasu oraz jego stężenie jest zależne od gatunku a nawet szczepu bakterii, ale również od innych czynników jak pH, temperatury czy użytego podłoża. Wskazuje się, że pałeczki kwasu mlekowego produkują głównie kwas mlekowy, octowy, bursztynowy, cytrynowy, mrówkowy oraz propionowy, jednakże to kwas mlekowy jest dominującym kwasem wytwarzanym przez te bakterie w najwyższych stężeniach [155]. Kwasy organiczne wytwarzane przez *Lactobacillus*, obniżają pH danego środowiska, tworząc je silnie kwasowym, co ogranicza wzrost bakterii patogennych a tym samym stanowi jeden z mechanizmów tych drobnoustrojów, zapewnianiający homeostazę w środowisku pochwy lub w drogach moczowych. Zdecydowana większość prac naukowych koncentruje się na charakterystyce kwasów organicznych produkowanych przez *Lactobacillus* w drogach rodnych, szczególnie na kwasie mlekowym, dlatego też wyniki niniejszej pracy stanowią istotny element uzupełniający wiedzę na ten temat. Badania Chung i in. [156] wykazały, że izolaty *Lactocaseibacillus rhamnosus* (dawniej *Lactobacillus rhamnosus*) z pochwy, wytwarzają kwas mlekowy, cytrynowy oraz mrówkowy, z czego to kwas mlekowy był produkowany w najwyższych stężeniach. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy. Badane szczepy *Lactobacillus*

produkowały kwas mlekowy w stężeniach od 7,59 mmol do 25,09 mmol. Jest to podobne stężenie, które występuje w pochwie (średnio 20 mmol) [157] z kolei w drogach moczowych stężenie kwasu mlekowego jest już zdecydowanie niższe i wynosi od 0,6 mmol do 2 mmol [158]. Warto jednak podkreślić, że zagadnienia związane z analizą profilu kwasów organicznych w drogach rodnych oraz moczowych nadal nie są w pełni scharakteryzowane a aspekt ten wymaga dalszej analizy i może przynieść wiele informacji na temat ich dobroczynnego wpływu na układ moczowo-płciowy.

W toku badań wykazano również, że badane kwasy organiczne hamują wzrost *P. mirabilis* oraz tworzenie biofilmu przez te patogeny a efekt ten jest zależny od stężenia i rodzaju użytego kwasu. Kwas cytrynowy hamował wzrost oraz tworzenie biofilmu *P. mirabilis* najefektywniej. Podobne wyniki otrzymał zespół Amrutha i in. [159] który wykazał, że spośród kwasów: octowego, cytrynowego oraz mlekowego, to te dwa ostatnie hamują tworzenie biofilmu *E. coli* i *Salmonella* spp. najintensywniej. Właściwości hamujące różnych kwasów organicznych zostały wykazane wobec biofilmów tworzonych przez wiele patogenów m.in. *E. coli*, *L. monocytogenes* [159], w tym też uropatogenów, np. *P. mirabilis* [102]. Powszechnym zjawiskiem jest tworzenie przez patogeny biofilmów na cewnikach, co chroni drobnoustroje przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza oraz działaniem antybiotyków. Wyjątkowo niebezpieczny wydaje się być fakt tworzenia biofilmów krystalicznych przez *P. mirabilis*, które mogą prowadzić do inkrustacji a w konsekwencji do zablokowania cewników [160].

Mechanizmy działania kwasów organicznych na bakterie obejmują zwiększanie wewnątrzkomórkowego ciśnienia osmotycznego, zwiększanie przepuszczalności bakteryjnej błony zewnętrznej, hamowanie syntezy różnych biomolekuł czy zakwaszanie cytoplazmy [97]. Mechanizm ten potwierdzono w tej pracy doktorskiej, gdyż wskazano, że kwas cytrynowy, mlekowy oraz bursztynowy wnikają przez błonę komórkową *P. mirabilis* i zaburzają ich funkcję komórkowe. Podobne wyniki, działania kwasów organicznych na błonę komórkową bakterii wykazały m.in. badania zespołu Ji i in. [97] którzy wykazali, że kwas octowy, mlekowy, masłowy, cytrynowy i jabłkowy uszkadzają błonę komórkową *E. coli* oraz hamują tworzenie biofilmu przez ten patogen.

Wyniki tej części pracy wskazują, że działanie drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* na patogeny jest złożone i jednym z mechanizmów ich działania jest wydzielanie kwasów organicznych, które uszkadzają błonę komórkową uropatogenów, prowadząc do ich śmierci. Ten etap umożliwił poznanie i zrozumienie interakcji jakie zachodzą w drogach moczowych pomiędzy drobnoustrojami komensalnymi a patogenami. Wyniki tego etapu, stanowią punkt wyjścia do dalszych rozważań, przede wszystkim analiz związanych z działaniem szczepów *Lactobacillus* na rozwój infekcyjnych kamieni moczowych spowodowanych infekcjami *P. mirabilis*.

P. mirabilis, patogen dróg moczowych, charakteryzuje się wysoką aktywnością ureazy co czyni go drobnoustrojem zaangażowanym w procesy tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych. Stąd też, w ramach drugiego etapu badań dokonano oceny wpływu badanych szczepów *Lactobacillus* na tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych (Publikacja 2). Do badań wybrano szczepy *Lactobacillus*, które najefektywniej hamowały krystalizację składników moczu indukowaną przez *P. mirabilis*: *L. crispatus* 1.2, *L. crispatus* 4, *L. gasseri* 35.3 oraz szczep *L. jensenii* 22.2, który wykazywał słabsze właściwości hamujące proces krystalizacji. Podobnie, do tego etapu wykorzystano cztery szczepy *P. mirabilis*. *P. mirabilis* KP i K8/MC, w których obecności, krystalizacja była najintensywniejsza, oraz *P. mirabilis* 5628 i 608/221, które wykazywały słabsze zdolności krystalizacji mineralnych składników moczu. Wyniki wykazały, że badane szczepy *L. crispatus*, *L. jensenii* i *L. gasseri* hamują proces krystalizacji w obecności badanych szczepów *P. mirabilis*, z różną intensywnością. *L. gasseri* wyróżniał się spośród pozostałych jako szczep, w obecności którego zawartość jonów wapnia oraz magnezu, pH, wytwarzanie amoniaku było najniższe. Zdjęcia z mikroskopu kontrastowo-fazowego również wykazały, że w jego obecności, po 6 godzinach inkubacji ze szczepami *P. mirabilis*, kryształy struwitu i apatytu były mniejsze w porównaniu do kontroli lub nie było ich wcale. Nie ma wielu danych literaturowych dotyczących wpływu drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* na tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych, stąd też wyniki tej pracy uzupełniają wiedzę na ten temat. Wcześniejsze wyniki dotyczące wpływu *Lactobacillus* na krystalizację, dały odmienne rezultaty [149]. Badania wykazały, że szczepy *Lactobacillus* izolowane z żywności mogą nasilać procesy krystalizacji. W próbach w obecności *L. brevis* oraz *L. plantarum* kryształy struwitu były większe w porównaniu do kontroli, z czystą hodowlą *P. mirabilis* w moczu syntetycznym. Porównując te wyniki do wyników

uzyskanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, można przypuszczać, że szczepy *Lactobacillus* wyizolowane z dróg moczowych mają pewne specyficzne cechy, które warunkują ich właściwości antagonistyczne wobec uropatogenów, co ma również wpływ na rozwój chorób związanych z tym układem. Rzeczywiście, drobnoustroje tego samego gatunku lub rodzaju mogą się od siebie znacznie różnić w zależności od miejsca bytowania. Badania Petrova i in. [161] pokazały, że *Lactobacillus* posiadają zdolności adaptacyjne, umożliwiające bytowanie w różnych środowiskach jak jelita czy układ moczowo-płciowy. W powyższych badaniach w izolatach *Lactobacillus* z pochwy zidentyfikowano locus spaCBA, odpowiadający za skuteczną adhezję bakterii do nabłonka jelitowego za pomocą fimbrii, z kolei nie wykryto go w izolatach z produktów mlecznych oraz z cewki moczowej.

Jednym ze wskazanych mechanizmów działania *Lactobacillus* na *P. mirabilis* jest ich działanie przeciwbakteryjne. Właściwości te, mogą również wpływać na powstawanie kamieni moczowych, poprzez hamowanie żywotności patogenów, co wykazano w niniejszej pracy. Jednakże, wyniki tej części pracy wskazały na jeszcze jeden mechanizm działania szczepów *Lactobacillus*. Badania kinetyki reakcji enzymatycznej oraz badania *in silico*, wykazały, że kwas L-mlekowy produkowany przez szczepy *Lactobacillus* ma wpływ na aktywność ureazy poprzez oddziaływanie kompetycyjne z centrum aktywnym ureazy, enzymu niezbędnego w procesie tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych. Stanowi to pierwsze doniesienie naukowe wykazujące hamowanie aktywności ureazy przez wspomniany kwas mlekowy. Poszukiwanie skutecznych i bezpiecznych inhibitorów ureazy jest celem wielu autorów prac naukowych. Obecna terapia leczenia infekcyjnych kamieni moczowych, oprócz antybiotykoterapii oraz chirurgicznych metod usuwania kamieni, opiera się również na zakwaszaniu moczu lub stosowaniu inhibitorów ureazy, najczęściej kwasu acetohydroksamowego (AHA). AHA zmniejsza wzrost kamieni oraz częstość nawrotów tej choroby. Wykazuje działanie synergistyczne wraz z antybiotykami. Jednakże, mnogość efektów ubocznych, stanowi zagrożenie w skutecznym i bezpiecznym stosowaniu tego środka. Wskazuje się, że nawet 30% pacjentów przyjmujących ten środek, odczuwa efekty uboczne takie jak: drżenie, ból głowy, objawy żołądkowo-jelitowe. Dodatkowo, u 3-15% pacjentów pojawić się może niedokrwistość hemolityczna [162]. Stąd też, niezbędne wydaje się odkrycie bezpiecznego środka, hamującego aktywność ureazy, będącego alternatywą dla obecnie stosowanego kwasu

aceto hydroksamowego. Wydaje się to być również priorytetem dla badaczy, stąd też wiele prac naukowych skupia się na tym zagadnieniu. Milo i in. [163] wykazali oddziaływania konkurencyjne substancji niskocząsteczkowej 2-MA z ureazą w badaniach kinetycznych oraz analizach dokowania *in silico*, co jak podkreślili autorzy mogłoby zapobiegać inkrustacji i blokowaniu cewników moczowych. Z kolei Li i in. [164] dowiedli, że pochodne związku tiomocznika hamują aktywność ureazy *Helicobacter pylori*, przy stężeniach niższych niż stosowany klinicznie kwas AHA. Mimo wszystko, badania dotyczące cytotoksyczności potencjalnych inhibitorów wobec komórek eukariotycznych w celu oceny ich bezpieczeństwa oraz badania analizujące ich skuteczność w warunkach *in vivo*, muszą stanowić kolejnym kluczowy etap badań, podobnie jak badania dotyczące kwasu L-mlekowego jako inhibitora ureazy *P. mirabilis* i jego roli w tworzeniu infekcyjnych kamieni moczowych.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, w kolejnym etapie oceniono wpływ substancji zewnątrzkomórkowych *Lactobacillus* na krystalizację składników moczu oraz patogenność *P. mirabilis* (Publikacja 3). Do tego zadania badawczego wybrano dwa szczepy *Lactobacillus*. *L. gasseri* jako szczep, który hamował krystalizację najintensywniej oraz *L. jensenii* który wykazywał najsłabsze właściwości hamujące ten proces. Do doświadczeń wykorzystano system insertów o średnicy porów 0,4 μm które umożliwiły swobodną dyfuzję produktów przemiany materii *Lactobacillus*, jednocześnie zapobiegając mieszaniu się komórek. W toku analiz, badano wpływ substancji wydzielanych przez *Lactobacillus* na krystalizację, adhezję bakterii i kryształów do nabłonka pęcherza moczowego oraz cytotoksyczność indukowaną szczepami *P. mirabilis* wobec komórek pęcherza moczowego.

Tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych rozpoczyna się od adhezji bakterii do nabłonka dróg moczowych. Patogeny *P. mirabilis* charakteryzują się wysokimi zdolnościami adhezyjnymi zarówno do nabłonka dróg moczowych jak i powierzchni abiotycznych, które zapewniają im adhezyny oraz fimbrie [8]. W czasie badań wykazano, że substancje zewnątrzkomórkowe *L. gasseri* istotnie hamują adhezję szczepów *P. mirabilis* KP i 5628 do nabłonka pęcherza moczowego. Podobne wyniki wykazały analizy zespołu Osset i in. [107], którzy wykazali, że hamowanie adhezji wielu uropatogenów, w tym *P. mirabilis* do komórek nabłonka pochwy jest zależne od szczepu *Lactobacillus*. Różne szczepy *Lactobacillus* hamowały adhezję tych pałeczek do komórek eukariotycznych do nawet 83,2%.

Substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus*, a w szczególności substancje wytwarzane przez szczep *L. gasseri*, hamują również cytotoksyczność wobec komórek pęcherza moczowego indukowaną szczepami *P. mirabilis*, nawet do 35% w obecności szczepu *P. mirabilis* 5628. Zespół Banerjee i in. [165] przedstawił podobne wyniki. Zarówno szczep bakteryjny *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B-30892, jak i supernatant bezkomórkowy, hamowały cytotoksyczność *Clostridium difficile* w stosunku do komórek Caco-2. Autorzy tej pracy sugerują, że badany szczep *Lactobacillus* hamuje cytotoksyczność poprzez inaktywację toksyn *C. difficile*. Z kolei badania Maudsotter i in. [166] pokazały, że kwas mlekowy produkowany przez *Lactobacillus* obniża cytotoksyczność wobec komórek nabłonkowych gardła indukowaną paciorkowcami grupy A, poprzez degradację kwasu lipotejchojowego tych bakterii. Podsumowując wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie oraz wyniki innych autorów, pałeczki kwasu mlekowego oraz wytwarzany przez nie kwas mlekowy mogą hamować cytotoksyczność indukowaną wieloma patogenami wobec komórek eukariotycznych za pomocą wielu mechanizmów działania.

Wyniki niniejszej dysertacji przyniosły również wiele informacji na temat wpływu substancji zewnątrzkomórkowych na krystalizację indukowaną szczepami *P. mirabilis*. *L. gasseri* intensywnie hamował te procesy, w przeciwieństwie do szczepu *L. jensenii*, który wykazywał słabsze właściwości inhibujące ten proces. Potwierdziły to badania oceny ilości wytwarzania amoniaku, zawartości jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} oraz obrazowanie mikroskopowe, gdzie w obecności substancji zewnątrzkomórkowych *L. gasseri* nie obserwowano kryształów struwitu, w porównaniu do kontroli, gdzie osiągały wielkość nawet 150 μm . Podobne wyniki zaobserwowano w przypadku badania krystalizacji związanej z nabłonkiem, z wykorzystaniem linii komórkowej pęcherza moczowego. *L. gasseri* hamował krystalizację związaną z nabłonkiem intensywniej niż *L. jensenii*, a w jego obecności obserwowano niższą zawartość jonów budujących kryształy apatytu oraz niższe stężenie wytwarzanego amoniaku. Dobrze zobrazowały to barwienia wykonane podczas tego zadania badawczego. Szczególnie w układzie ze szczepem *P. mirabilis* 5628 oraz substancjami zewnątrzkomórkowymi *L. gasseri* obserwowano mniej złogów wapnia wewnątrz komórek eukariotycznych jak i na zewnątrz, natomiast w obrazowaniu konfokalnym w ogóle nie obserwowano kryształów w tym układzie badawczym. Wyniki tej części pracy przyniosły wiele informacji, przede wszystkim wykazały, że substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus*, mogą hamować

adhezję, cytotoksyczność komórek pęcherza moczowego oraz krystalizację indukowaną szczepami *P. mirabilis*.

W pierwszych etapach badań niniejszej rozprawy scharakteryzowano, że głównymi substancjami wydzielanymi przez *Lactobacillus*, o charakterze przeciwbakteryjnym wobec *P. mirabilis* są kwasy organiczne. W kolejnych etapach badań, dodatkowo wykazano, że kwas L-mlekowy może hamować aktywność kluczowego enzymu *P. mirabilis*- ureazy. Stąd też, w ramach dalszych doświadczeń oznaczono zawartość L i D kwasu mlekowego oraz kwasu bursztynowego wytwarzanych przez badane szczepy *L. jensenii* oraz *L. gasseri*. Kwas mlekowy może być produkowany w postaci dwóch izomerów: kwasu L-mlekowego oraz D-mlekowego. Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* mogą wytwarzać oba izomery tego kwasu [167]. Jednakże badania Witkin i in. [168] wykazały, że stężenie kwasu L-mlekowego oraz D-mlekowego w pochwie kobiet zdominowanej przez *L. gasseri* jest wyższe w porównaniu do stężenia tych kwasów w pochwie zdominowanej przez inne gatunki jak *L. crispatus* lub *L. jensenii* i wynosiło 2,92 mM dla kwasu D-mlekowego oraz 2,23 mM dla kwasu L-mlekowego. Dla porównania, w pochwie kobiet z dominującym gatunkiem *L. jensenii* wartości te wynosiły 0,45 mM dla kwasu D-mlekowego oraz 0,85 mM dla kwasu L-mlekowego. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej są podobne, jednakże stężenia kwasów wytwarzanych przez szczepy *Lactobacillus* znacznie wyższe. Tutaj również szczep *L. gasseri* wyróżniał się wytwarzaniem wysokich stężeń kwasu L-mlekowego (średnio w 6 godzinie 17,47 mM), z kolei stężenia kwasu D-mlekowego były znacznie niższe (średnio w 6 godzinie 3,0 mM). Z kolei, *L. jensenii* wytwarzał wysokie stężenia kwasu bursztynowego (średnio w 6 godzinie 3,5 mM) oraz wyższe stężenia kwasu D-mlekowego (średnio w 6 godzinie 3,6 mM) niż kwasu L-mlekowego, którego stężenie w 6 godzinie wynosiło średnio 0,6 mM.

L. gasseri 35.3 wyróżniał się na tle innych badanych szczepów *Lactobacillus* najsilniejszymi właściwościami hamowania krystalizacji, adhezji czy cytotoksyczności komórek eukariotycznych indukowanych *P. mirabilis*. Co istotne, cechuje go również zdolność do produkowania wysokich stężeń kwasu L-mlekowego w środowisku moczu syntetycznego. Wskazuje to, że kwas L-mlekowy może odpowiadać za te właściwości, poprzez hamowanie aktywności ureazy. Co ciekawe, zespół badawczy Witkin i in. [168], wskazał, że to głównie izomer D kwasu mlekowego świadczy o zdrowiu dróg rodnych

kobiet. Autorzy pracy zasugerowali, że kobiety w których pochwie dominuje *L. insers*, produkujący głównie kwas L-mlekowy, są bardziej podatne na infekcje tego układu.

Zazwyczaj powstałe w procesie krystalizacji kryształy struwitu i apatyty są na tyle małe, że z łatwością zostają wypłukiwane wraz z moczem, nie uszkadzając przy tym komórek nabłonka dróg moczowych. Sam proces powstawania kryształów struwitu i apatyty nie wystarczy, aby w warunkach fizjologicznych utworzyły się kamienie moczowe. W kolejnym etapie musi zajść ich agregacja, czyli inaczej łączenie się wielu kryształów w większy aglomerat co prowadzi do tworzenia się kamienia i jego zatrzymywania w drogach moczowych. Etap ten jest kluczowy oraz zachodzi niezwykle szybko [169]. Stąd też, w kolejnym etapie, który stanowi część wyników nieopublikowanych niniejszej rozprawy, oceniano wpływ substancji zewnątrzkomórkowych *L. jensenii* oraz *L. gasseri* na agregację kryształów struwitu. Według danych literaturowych, polisacharydy oraz białka *Lactobacillus*, mogą wpływać na ładunek komórkowy, hydrofobowość komórki [144] oraz mają zdolność do wiązania jonów wapnia oraz magnezu [170], co może mieć wpływ na procesy krystalizacji oraz agregacji kryształów. Wyniki niniejszej pracy wykazały, że w obecności polisacharydów wyizolowanych ze szczepu *L. jensenii*, rzeczywiście tworzą się większe agregaty kryształów struwitu w porównaniu do kontroli, bez ich dodatku. Potwierdził to pomiar potencjału zeta, który wykazał, że układ koloidalny w obecności cukrów *L. jensenii* jest mniej stabilny, a kryształy struwitu w nim obecne mają większą tendencję do agregacji i tworzenia większych agregatów w porównaniu do kontroli. Kryształy struwitu otrzymywane w tym etapie badań zostały uzyskane za pomocą metody chemicznej, z użyciem amoniaku, co eliminowało wykorzystanie drobnoustrojów *P. mirabilis*, które również mają wpływ na proces agregacji. Pałeczki *P. mirabilis*, mogą agregować z kryształami i wbudowywać się w strukturę kamienia moczowego. Umożliwia to skuteczną ochronę patogenów przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza oraz antybiotykami, jednocześnie umożliwiając dostęp do składników odżywczych [33]. Bakterie mogą również służyć jako miejsca przylegania kryształów i w ten sposób intensyfikować agregację [32]. Substancje pochodzenia bakteryjnego *P. mirabilis* jak polisacharydy czy białka również mają wpływ na procesy agregacji. Badania Prywer i in. [171] wskazały, że lipopolisacharyd *P. mirabilis* nasila agregację kryształów apatyty. Z kolei późniejsze badania Prywer i in. [34] wykazały, że intensywność agregacji jest zależna od stężenia LPS *P. mirabilis*. Wyniki tej pracy wykazały, że

stężenia, które odpowiadają stężeniom wykazywanym podczas infekcji bakteryjnych dróg moczowych przez *P. mirabilis* zwiększają agregację kryształów apatytu. Tymczasem, wyższe stężenia LPS (360 µg/ml, 440 µg/ml) hamowały tworzenie agregatów. Zaproponowany przez powyższych autorów mechanizm hamowania agregacji przez LPS sugeruje, że wysokie stężenia lipopolisacharydu, zbudowanego z lipidów oraz długich łańcuchów polisacharydów, pokrywają kryształy apatytu, co hamuje tworzenie większych agregatów. Podobny mechanizm wykazali Ou i in. [172] badając polisacharyd- heparynę na agregację kryształów szczawianów wapnia. W toku badań dowiedziono, że heparyna może być adsorbowana na powierzchni kryształów szczawianów wapnia, co prowadzi do wzrostu wartości potencjału zeta a tym samym wzrostu sił odpychania elektrostatycznego pomiędzy nimi. Prowadzi to do zmniejszonej podatności do agregowania kryształów. Wyniki tego etapu badań wskazują, że składniki zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus* mogą mieć wpływ na proces agregacji kryształów struwitu. W kolejnych etapach warto byłoby dokładnie scharakteryzować różnice w składzie polisacharydów wytwarzanych przez oba badane szczepy, *L. jensenii* oraz *L. gasseri* oraz wskazać mechanizm ich działania. Na skład polisacharydów *Lactobacillus* może mieć wpływ wiele czynników jak miejsce bytowania czy gatunek lub nawet szczep drobnoustroju. Przykładowo badania Petrova i in. [161] wykazały, że szczep *L. rhamnosus* wyizolowany z cewki moczowej, wytwarza inne egzopolisacharydy, niż izolat *L. rhamnosus* z pochwy. Polisacharydy wytwarzane przez ten drugi szczep, bogate były w glukozę i pozbawione ramnozy, co powiązano z lepszą odpornością na stres oksydacyjny. Stąd też, przypuszczenie, że szczep *L. jensenii* być może ma inny profil wytwarzanych polisacharydów niż *L. gasseri*, które sprzyjają procesom agregacji kryształów struwitu.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej są kompleksową analizą wpływu szczepów *Lactobacillus* izolowanych z moczu na wszystkie etapy powstawania infekcyjnych kamieni moczowych oraz patogenność *P. mirabilis*. Wyniki wskazują, że *Lactobacillus* spp, należące do naturalnej mikrobioty dróg moczowych, mają zdolność hamowania krystalizacji składników moczu poprzez działanie przeciwbakteryjne wobec szczepów *P. mirabilis* oraz, co udało się udowodnić po raz pierwszy, wytwarzany przez *Lactobacillus* kwas L-mlekowy może hamować aktywność ureazy poprzez oddziaływania kompetycyjne. Dodatkowo, wyniki niniejszej dysertacji sugerują, że substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus* mają wpływ na

agregację kryształów struwitu, natomiast ten etap badań wymaga dalszych analiz. Wiedza ta może się przyczynić do lepszego zapobiegania oraz wspomagania leczenia ZUM oraz chorób z nią związanych jak zakażenia układu moczowego związane z cewnikowaniem czy rozwój infekcyjnej kamicy moczowej. Ważnym proponowanym rozwinięciem badań nad interakcjami drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* i wytwarzanych przez nie składników na infekcje *P. mirabilis* oraz tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych byłoby wykorzystanie modeli zwierzęcych w badaniach *in vivo*.

VII. Streszczenie w języku polskim

Zakażenia układu moczowego (ZUM) to jedne z najczęstszych chorób infekcyjnych występujących u ludzi. *Proteus mirabilis* to częsty patogen dróg moczowych, szczególnie zakażeń związanych z długotrwałym cewnikowaniem. Infekcje tymi drobnoustrojami mogą prowadzić do wielu powikłań, w tym powstawania infekcyjnych kamieni moczowych. Ich tworzenie można podzielić na kilka głównych etapów. W pierwszej kolejności dochodzi do adhezji patogenów do nabłonka dróg moczowych. Następnie zachodzi krystalizacja składników mineralnych moczu, pod wpływem bakteryjnego enzymu- ureazy, która rozkłada mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla. W kolejnym etapie dochodzi do agregacji kryształów i tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych, które zatrzymują się w drogach moczowych. Ze względu na nieskuteczne metody leczenia oraz prewencji chorób związanych z infekcjami dróg moczowych, ciekawym aspektem może być wykorzystanie naturalnej mikrobioty dróg moczowych we wspomaganiu terapii ZUM i poznanie mechanizmów ich działania wobec uropatogenów. *Lactobacillus* spp. to pałeczki bytujące w tym środowisku. Zapewniają one homeostazę poprzez wydzielanie wielu substancji o charakterze przeciwbakteryjnym jak kwasy organiczne, bakteriocyny czy nadtlenuk wodoru. Ponadto, wykazują one wiele właściwości antagonistycznych wobec patogenów, jak na przykład konkurencja z patogenami o składniki odżywcze oraz hamowanie adhezji patogenów do komórek nabłonka.

Celem pracy była ocena wpływu drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus*, należących do naturalnej mikrobioty dróg moczowych na patogenność *P. mirabilis* oraz tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych. W toku badań analizowano wpływ szczepów *Lactobacillus* na każdy etap ich tworzenia. Badano ich wpływ na adhezję *P. mirabilis* do nabłonka, wrażliwość tych patogenów na substancje przeciwbakteryjne *Lactobacillus*, krystalizację składników mineralnych moczu oraz na agregację powstałych kryształów.

Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* zostały wyizolowane z dróg moczowych zdrowych ludzi, natomiast szczepy *P. mirabilis* pochodziły z moczu osób ze współistniejącą kamicą oraz z kamieni moczowych. W badaniach wykazano, że substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus* hamują patogenność szczepów

P. mirabilis poprzez wielokierunkowe działanie. *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. saerimneri* oraz *L. jensenii* wykazywały silne działanie przeciwbakteryjne wobec badanych szczepów *P. mirabilis*. Analizy chromatograficzne wykazały, że to głównie kwasy organiczne odpowiadają za te właściwości. Kwas mlekowy, kwas bursztynowy oraz kwas cytrynowy oznaczone jako kwasy produkowane przez badane szczepy *Lactobacillus* hamowały wzrost oraz tworzenie biofilmu *P. mirabilis*. Określono również, że zachodzi to poprzez niszczenie błony komórkowej *P. mirabilis* co prowadzi do śmierci tych komórek. Ponadto, substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus* hamowały adhezję *P. mirabilis* do nabłonka dróg moczowych oraz cytotoksyczność wobec komórek pęcherza moczowego indukowaną tymi uropatogenami.

W kolejnych etapach badań wykazano, że wyizolowane szczepy należące do drobnoustrojów komensalnych układu moczowego oraz substancje zewnątrzkomórkowe które wytwarzają, hamują krystalizację składników mineralnych moczu indukowaną szczepami *P. mirabilis*, czyli jeden z pierwszych etapów powstawania infekcyjnych kamieni moczowych. Wskazano, że ma to związek z ich właściwościami przeciwbakteryjnymi oraz dowiedziono, co stanowi pierwsze takie doniesienie, że wytwarzany przez *Lactobacillus*, kwas L-mlekowy ma wpływ na kluczowy czynnik wirulencji *P. mirabilis*- ureazę. Umożliwiły to analizy kinetyki reakcji enzymatycznej oraz badania dokowania molekularnego, które wykazały oddziaływania kompetycyjne kwasu L-mlekowego z centrum aktywnym tego enzymu.

Agregacja kryształów struwitu i apatytu to kolejny etap tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych. Wyniki niniejszej pracy sugerują, że substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus*, głównie polisacharydy mają wpływ również i na ten proces. Okazało się, że cukry *L. jensenii* wzmagają ten proces, poprzez tworzenie większych agregatów kryształów struwitu.

Podsumowując, w świetle powyższych wyników można uznać szczepy *Lactobacillus* oraz wytwarzany przez nie kwas L-mlekowy jako potencjalny środek mogący w przyszłości wspomagać leczenie ZUM oraz infekcyjnych kamicy moczowej lub być skutecznym środkiem prewencji tych chorób.

VIII. Streszczenie w języku angielskim

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most frequent infectious diseases occurring in humans. *Proteus mirabilis* is a common pathogen of the urinary tract, especially infections associated with long-term catheterization. Infections with these microorganisms can lead to many complications, including the formation of infectious urinary stones. Their formation can be divided into several main stages. The first stage is the adhesion of pathogens to the urinary tract epithelium. Subsequently, due to the activity of the urease enzyme which hydrolyzes urea into ammonia and carbon dioxide, crystallization of urine mineral components occurs. In the next stage, crystals aggregate which causes the formation of urinary stones and their retention in the urinary tract. Due to the ineffective methods of treatment and prevention of diseases related to UTI, an interesting aspect may be the use of the natural microbiota of the urinary tract to support the treatment of UTI, and understanding the mechanisms of their action against uropathogens. *Lactobacillus* spp. are bacteria belonging to this habitat. They ensure homeostasis by secreting many antibacterial substances, such as organic acids, bacteriocins, and hydrogen peroxide. Moreover, they exhibit many antagonistic properties against pathogens, such as competition with pathogens for nutrients and inhibition of pathogens adhesion to epithelial cells.

The aim of the study was to assess the influence of microorganisms of the *Lactobacillus* genus, belonging to the natural microbiota of the urinary tract, on the pathogenicity of *P. mirabilis* and the formation of infectious urinary stones. During the research, the impact of *Lactobacillus* strains at each stage of their development was analyzed. Their influence on the adhesion of *P. mirabilis* to the epithelium, the sensitivity of these pathogens to substances produced by *Lactobacillus*, the crystallization of urine mineral components, and the aggregation of crystals were examined.

Microorganisms of the *Lactobacillus* genus were isolated from the urinary tract of healthy people, while *P. mirabilis* strains were collected from the urine of individuals with diagnosed infectious urolithiasis and from urinary stones. Studies have shown that extracellular substances of *Lactobacillus* inhibit the pathogenicity of *P. mirabilis* strains through multidirectional action. *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. saerimneri*, and *L. jensenii* showed strong antibacterial activity against the tested strains of *P. mirabilis*.

Chromatographic analyses showed that organic acids are mainly responsible for these properties. Lactic acid, succinic acid, and citric acid produced by the tested *Lactobacillus* strains inhibited the growth and formation of *P. mirabilis* biofilm. It was also determined that this occurs by destroying the cell membrane of *P. mirabilis*, which leads to the death of these cells. Moreover, extracellular substances of *Lactobacillus* inhibited the adhesion of *P. mirabilis* to the urinary tract epithelium and the cytotoxicity of bladder cells induced by these uropathogens.

Furthermore, the next stages of research showed that isolated strains belonging to the commensal microbiota of the urinary tract and the produced extracellular substances inhibit the crystallization of urine mineral components induced by *P. mirabilis* strains, which is one of the first stages of the formation of infectious urinary stones. It was indicated that this is related to their antibacterial properties. Moreover, it was proven, which is the first such report, that L-lactic acid produced by *Lactobacillus*, suppresses the activity of urease, the main virulence factor of *P. mirabilis*. This was made possible by analyses of the kinetics of the enzymatic reaction and molecular docking studies, which showed competitive interaction of L-lactic acid with the active center of this enzyme.

Aggregation of struvite and apatite crystals is the next stage in the formation of infectious urinary stones. The results of this study suggest that extracellular substances of *Lactobacillus*, mainly polysaccharides, also influence this process. It turned out that the extracellular polysaccharides of *L. jensenii* enhance this process by creating larger aggregates of struvite crystals.

In conclusion, *Lactobacillus* strains and the L-lactic acid produced by them can be considered as a potential agent that may support the treatment of UTI and infectious urolithiasis in the future, or be an effective agent for preventing these diseases.

IX. Literatura

1. Flores-Mireles, A.L.; Walker, J.N.; Caparon, M.; Hultgren, S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* **2015**, *13*(5):269–84. doi:10.1038/nrmicro3432
2. Storme, O.; Saucedo, J.T.; Garcia-Mora, A.; Dehesa-Dávila, M.; Naber, K.G. Risk factors and predisposing conditions for urinary tractinfection. *Ther Adv Urol.* **2019**, *11*:19–28. doi:10.1177/1756287218814382
3. Salari, N.; Karami, M.M.; Bokaei, S.; Chalesghar, M.; Shohaimi, S.; Akbari, H.; et al. The prevalence of urinary tract infections in type 2 diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Med Res.* **2022**, *27*(1):20. doi:10.1186/S40001-022-00644-9
4. Antinori, S.; Pezzani, M.D. Uncomplicated and complicated urinary tract infections in adults: the infectious diseases’s specialist perspective. In: Tonolini, M. (eds) *Imaging Interv Urin Tract Infect Urosepsis*. Springer, Cham. **2018**. doi:10.1007/978-3-319-68276-1_3
5. Wagenlehner, F.M.E.; Bjerklund Johansen, T.E.; Cai, T.; Koves, B.; Kranz, J.; Pilatz, A.; et al. Epidemiology, definition and treatment of complicated urinary tract infections. *Nat Rev Urol.* **2020**, *17*:586–600. doi:10.1038/s41585-020-0362-4
6. Adeolu, M.; Alnajar, S.; Naushad, S.; Gupta, R.S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the “Enterobacteriales”: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **2016**, *66*(12):5575–99. doi:10.1099/ijsem.0.001485
7. Armbruster, C.E.; Mobley, H.L.T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat Rev Microbiol.* **2012**, *10*(11):743–54. doi:10.1038/nrmicro2890
8. Yuan, F.; Huang, Z.; Yang, T.; Wang, G.; Li, P.; Yang, B.; et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in catheter-associated urinary tract infections. *Urol Int.* **2021**, *105*(5-6):354–61. doi:10.1159/000514097
9. Klein, R.D.; Hultgren, S.J. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat Rev Microbiol.* **2020**, *18*(4):211–26. doi:10.1038/s41579-020-0324-0
10. Schaffer, J.N.; Norsworthy, A.N.; Sun, T.T.; Pearson, M.M. *Proteus mirabilis* fimbriae- and urease-dependent clusters assemble in an extracellular niche to initiate bladder stone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016**, *113*(16):4494-9. doi:10.1073/pnas.1601720113
11. Ma, K.L.; Wang, C.X. Analysis of the spectrum and antibiotic resistance of uropathogens *in vitro*: results based on a retrospective study from a tertiary hospital. *Am J Infect Control.* **2013**, *41*(7):601–6. doi:10.1016/j.ajic.2012.09.015
12. Schito, G.C.; Naber, K.G.; Botto, H.; Palou, J.; Mazzei, T.; Gualco, L.; et al. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* **2009**, *34*(5):407–13. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.04.012
13. Adamus-Bialek, W.; Zajac, E.; Parniewski, P.; Kaca, W. Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains. *Mol Biol Rep.* **2013**, *40*(4):3429-35. doi:10.1007/s11033-012-2420-3

14. Nemzer, B. V.; Al-Taher, F.; Yashin, A.; Revelsky, I.; Yashin, Y. Cranberry: Chemical composition, antioxidant activity and impact on human health: Overview. *Molecules*. **2022**, 27(5):1503. doi:10.3390/molecules27051503
15. Lee, Y.L.; Najm, W.I.; Owens, J.; Thrupp, L.; Baron, S.; Shanbrom, E.; et al. Anti-microbial Activity of Urine after Ingestion of Cranberry: A Pilot Study. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2010**, 7(2):227-32. doi:10.1093/ecam/nem183
16. Takahashi, S.; Hamasuna, R.; Yasuda, M.; Arakawa, S.; Tanaka, K.; Ishikawa, K.; et al. A randomized clinical trial to evaluate the preventive effect of cranberry juice (UR65) for patients with recurrent urinary tract infection. *J Infect Chemother*. **2013**, 19(1):112–7. doi:10.1007/s10156-012-0467-7
17. Konesan, J.; Liu, L.; Mansfield, K.J. The Clinical Trial Outcomes of Cranberry, D-Mannose and NSAIDs in the Prevention or Management of Uncomplicated Urinary Tract Infections in Women: A Systematic Review. *Pathog*. **2022**, 11(12):1471. doi:10.3390/pathogens11121471
18. Stapleton, A.E.; Au-Yeung, M.; Hooton, T.M.; Fredricks, D.N.; Roberts, P.L.; Czaja, C.A.; et al. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin Infect Dis*. **2011**, 52(10):1212–7. doi:10.1093/cid/cir183
19. Foxman, B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol*. **2010**, 7(12):653–60. doi:10.1038/nrurol.2010.190
20. Różalski, A.; Sidorczyk, Z.; Kotełko, K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev*. **1997**, 61(1):65–89. doi:10.1128/mmbr.61.1.65-89.1997
21. Różalski, A.; Kwil, I.; Torzewska, A.; Baranowska, M.; Stączek, P. Bakterie z rodzaju *Proteus*- cechy i czynniki chorobotwórczości. *Postepy Hig Med. Dosw*. **2007**, 61: 204-219
22. Sampath, V.P. Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. *Agric Nat Resour*. **2018**, 52(2):115–20. doi:10.1016/j.anres.2018.08.002
23. McLean, R.J.C.; Nickel, J.C.; Noakes, V.C.; Costerton, J.W. An *in vitro* ultrastructural study of infectious kidney stone genesis. *Infect Immun*. **1985**, 49(3):805–11. doi:10.1128/IAI.49.3.805-811.1985
24. Broll, V.; Perin, A.P.A.; Lopes, F.C.; Martinelli, A.H.S.; Moyetta, N.R.; Fruttero, L.L.; et al. Non-enzymatic properties of *Proteus mirabilis* urease subunits. *Process Biochem*. **2021**, 110:263–74. doi:10.1016/j.procbio.2021.08.023
25. Lang, J.; Narendrula, A.; El-Zawahry, A.; Sindhvani, P.; Ekwenna, O. Global trends in incidence and burden of urolithiasis from 1990 to 2019: An analysis of global burden of disease study data. *Eur Urol open Sci*. **2022**, 35:37–46. doi:10.1016/j.euros.2021.10.008
26. López, M.; Hoppe, B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr Nephrol*. **2010**, 25(1):49–59. doi:10.1007/S00467-008-0960-5
27. Bartoletti, R.; Cai, T.; Mondaini, N.; Melone, F.; Travaglini, F.; Carini, M.; et al. Epidemiology and risk factors in urolithiasis. *Urol Int*. **2007**, 79:3–7. doi:10.1159/000104434
28. Kramer, G.; Klingler, H.C.; Steiner, G.E. Role of bacteria in the development of kidney stones. *Curr Opin Urol*. **2000**, 10(1):35–8. doi:10.1097/00042307-200001000-00009
29. Thomas, B.; Tolley, D. Concurrent urinary tract infection and stone disease: pathogenesis, diagnosis and management. *Nat Clin Pract Urol*. **2008**, 5(12):668–75. doi:10.1038/ncpuro1254

30. Marien, T.; Miller, N.L. Treatment of the Infected Stone. *Urol Clin North Am.* **2015**, 42(4):459–72. doi:10.1016/j.ucl.2015.05.009
31. Wang, Z.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Deng, Q.; Liang, H. Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation (Review). *Int J Mol Med.* **2021**, 48(2):149. doi:10.3892/ijmm.2021.4982
32. Prywer, J.; Sadowski, R.R.; Torzewska, A. Aggregation of struvite, carbonate apatite, and *Proteus mirabilis* as a key factor of infectious urinary stone formation. *Cryst Growth Des.* **2015**, 15(3):1446–51. doi:10.1021/cg5018032
33. Li, X.; Zhao, H.; Lockatell, C.V.; Drachenberg, C.B.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. *Infect Immun.* **2002**, 70(1):389-94. doi:10.1128/IAI.70.1.389-394.2002
34. Prywer, J.; Torzewska, A. Aggregation of poorly crystalline and amorphous components of infectious urinary stones is mediated by bacterial lipopolysaccharide. *Sci Reports.* **2019**, 9(1):17061. doi:10.1038/s41598-019-53359-z
35. Al-Dawah, M.J.; Al-Hamadany, A.H.; Al-Jarallah, E.M. The role of lipopolysaccharide and O-Antigen of *Proteus Mirabilis* in urinary stones formation, *in-vitro* study. *J Nat Sci Res.* **2015**, 5(23):47–52.
36. Torzewska, A.; Stączek, P.; Różalski, A. Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysaccharides. *J Med Microbiol.* **2003**, 52(Pt6):471–7. doi:10.1099/jmm.0.05161-0
37. Reyes, L.; Reinhard, M.; O'Donnell, L.J.; Stevens, J.; Brown, M.B. Rat strains differ in susceptibility to *Ureaplasma parvum*-induced urinary tract infection and struvite stone formation. *Infect Immun.* **2006**, 74(12):6656–64. doi:10.1128/IAI.00984-06
38. Espinosa-Ortiz, E.J.; Eisner, B.H.; Lange, D.; Gerlach, R. Current insights into the mechanisms and management of infection stones. *Nat Rev Urol.* **2019**, 16:35–53. doi:10.1038/s41585-018-0120-z
39. Prywer, J.; Mielniczek-Brzóska, E.; Olszynski, M. Struvite crystal growth inhibition by trisodium citrate and the formation of chemical complexes in growth solution. *J. Cryst. Growth.* **2015**, 418:92–101. doi:10.1016/j.jcrysgro.2015.02.027
40. Griffith, D.P.; Gleeson, M.J.; Lee, H.; Longuet, R.; Deman, E.; Earle, N. Randomized, double-blind trial of Lithostat (acetoxyhydroxamic acid) in the palliative treatment of infection-induced urinary calculi. *Eur Urol.* **1991**, 20(3):243–7. doi:10.1159/000471707
41. Pearle, M.S.; Goldfarb, D.S.; Assimos, D.G.; Curhan, G.; Denu-Ciocca, C.J.; Matlaga, B.R.; et al. Medical management of kidney stones: AUA guideline. *J Urol.* **2014**, 192(2):316–24. doi:10.1016/j.juro.2014.05.006
42. Yuvanc, E.; Yilmaz, E.; Tuglu, D.; Batislam, E. Medical and alternative therapies in urinary tract stone disease. *World J Nephrol.* **2015**, 4(5):492-99. doi:10.5527/wjn.v4.i5.492
43. McLean, R.J.C.; Downey, J.; Clapham, L.; Wilson, J.W.L.; Nickel, J.C. Pyrophosphate inhibition of *Proteus mirabilis*-induced struvite crystallization *in vitro*. *Clin Chim Acta.* **1991**, 200(2-3):107–17. doi:10.1016/0009-8981(91)90082-n
44. Prywer, J.; Olszynski, M.; Torzewska, A.; Mielniczek-Brzóska, E. Comparative *in vitro* studies on disodium EDTA effect with and without *Proteus mirabilis* on the crystallization of carbonate apatite and struvite. *J Cryst Growth.* **2014**, 395:123–31. doi:10.1016/j.jcrysgro.2014.03.008

45. Chauhan, C.K.; Joshi, M.J.; Vaidya, A.D.B. Growth inhibition of struvite crystals in the presence of herbal extract *Commiphora wightii*. *J Mater Sci Mater Med.* **2009**, 20(Suppl1):S85-92. doi:10.1007/s10856-008-3489-z
46. Chauhan, C.K.; Joshi, M.J. *In vitro* crystallization, characterization and growth-inhibition study of urinary type struvite crystals. *J Cryst Growth.* **2013**, 362:330–7. doi:10.1016/j.jcrysgro.2011.11.008
47. Bindhu, B.; Swetha, A.S.; Veluraja, K. Studies on the effect of phyllanthus emblica extract on the growth of urinary type struvite crystals *in vitro*. *Clin Phytoscience.* **2015**, 1(3). doi:10.1186/s40816-015-0004-1
48. Lieske, J.C. Probiotics for prevention of urinary stones. *Ann Transl Med.* **2017**, 5(2):29. doi:10.21037/atm.2016.11.86
49. Colella, M.; Topi, S.; Palmirotta, R.; D’Agostino, D.; Charitos, I.A.; Lovero, R.; et al. An Overview of the Microbiota of the Human Urinary Tract in Health and Disease: Current Issues and Perspectives. *Life (Basel).* **2023**, 13(7):1486. doi:10.3390/life13071486
50. Perez-Carrasco, V.; Soriano-Lerma, A.; Soriano, M.; Gutiérrez-Fernández, J.; Garcia-Salcedo, J.A. Urinary Microbiome: Yin and Yang of the Urinary Tract. *Front Cell Infect Microbiol.* **2021**, 11:617002. doi:10.3389/FCIMB.2021.617002
51. Mueller, E.R.; Wolfe, A.J.; Brubaker, L. The Female urinary microbiota. *Curr Opin Urol.* **2017**, 27(3):282–6. doi:10.1097/mou.0000000000000396
52. Price, T.K.; Dune, T.; Hilt, E.E.; Thomas-White, K.J.; Kliethermes, S.; Brincat, C.; et al. The clinical urine culture: enhanced techniques improve detection of clinically relevant microorganisms. *J Clin Microbiol.* **2016**, 54(5):1216–22. doi:10.1128/JCM.00044-16
53. Neugent, M.L.; Hulyalkar, N.V.; Nguyen, V.H.; Zimmern, P.E.; De Nisco, N.J. Advances in understanding the human urinary microbiome and its potential role in urinary tract infection. *MBio.* **2020**, 11(2):e00218-20. doi:10.1128/mBio.00218-20
54. Price, T.K.; Hilt, E.E.; Thomas-White, K.; Mueller, E.R.; Wolfe, A.J.; Brubaker, L. The urobiome of continent adult women: a cross-sectional study. *BJOG.* **2020**, 127(2):193–201. doi:10.1111/1471-0528.15920
55. Komesu, Y.M.; Dinwiddie, D.L.; Richter, H.E.; Lukacz, E.S.; Sung, V.W.; Siddiqui, N.Y.; et al. Defining the relationship between vaginal and urinary microbiomes. *Am J Obstet Gynecol.* **2020**, 222(2):154.e1-154.e10. doi:10.1016/j.ajog.2019.08.011
56. Pearce, M.M.; Hilt, E.E.; Rosenfeld, A.B.; Zilliox, M.J.; Thomas-White, K.; Fok, C.; et al. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio.* **2014**, 5(4):e01283. doi:10.1128/mBio.01283-14
57. Fouts, D.E.; Pieper, R.; Szpakowski, S.; Pohl, H.; Knoblach, S.; Suh, M.J.; et al. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J Transl Med.* **2012**, 10:174. doi:10.1186/1479-5876-10-174
58. Modena, B.D.; Milam, R.; Harrison, F.; Cheeseman, J.A.; Abecassis, M.M.; Friedewald, J.J.; et al. Changes in urinary microbiome populations correlate in kidney transplants with interstitial fibrosis and tubular atrophy documented in early surveillance biopsies. *Am J Transplant.* **2017**, 17(3):712–23. doi:10.1111/ajt.14038
59. Gottschick, C.; Deng, Z.L.; Vital, M.; Masur, C.; Abels, C.; Pieper, D.H.; et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome.* **2017**, 5(1):99. doi:10.1186/s40168-017-0305-3

60. Grobeisen-Duque, O.; Mora-Vargas, C.D.; Aguilera-Arreola, M.G.; Helguera-Repetto, A.C. Cycle biodynamics of women's microbiome in the urinary and reproductive systems. *J Clin Med.* **2023**, 12(12):4003. doi:10.3390/jcm12124003
61. Thomas-White, K.; Brady, M.; Wolfe, A.J.; Mueller, E.R. The bladder is not sterile: History and current discoveries on the urinary microbiome. *Curr Bl Dysfunct Rep.* **2016**, 11(1):18–24. doi:10.1007/s11884-016-0345-8
62. Lewis, D.A.; Brown, R.; Williams, J.; White, P.; Jacobson, S.K.; Marchesi, J.R.; et al. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol.* **2013**, 3:41. doi: 10.3389/fcimb.2013.00041
63. Thomas-White, K.; Forster, S.C.; Kumar, N.; Van Kuiken, M.; Putonti, C.; Stares, M.D.; et al. Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. *Nat Commun.* **2018**, 9:1557. doi:10.1038/s41467-018-03968-5
64. Dubourg, G.; Morand, A.; Mekhalif, F.; Godefroy, R.; Corthier, A.; Yacouba, A.; et al. Deciphering the urinary microbiota repertoire by culturomics reveals mostly anaerobic bacteria from the gut. *Front Microbiol.* **2020**, 11:513305. doi: 10.3389/fmicb.2020.513305
65. Lebeer, S.; Vanderleyden, J.; de Keersmaecker, S.C.J. Adaptation factors of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Benef Microbes.* **2010**, 1(4):335–42. doi:10.3920/BM2010.0032
66. Zhang, H.; Yeh, C.; Jin, Z.; Ding, L.; Liu, B.Y.; Zhang, L.; et al. Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate. *Synth Syst Biotechnol.* **2018**, 3(2):113–20. doi:10.1016/j.synbio.2018.03.001
67. Dempsey, E.; Corr, S.C. *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Front Immunol.* **2022**, 13:840245. doi:10.3389/fimmu.2022.840245
68. Gajewska, J.; Błaszczyk, M.K. Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Postępy Mikrobiol.* **2012**, 51(1):55-65
69. Chapot-Chartier, M.P.; Kulakauskas, S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact.* **2014**, 13(Suppl1):1–23. doi: 10.1186/1475-2859-13-s1-s9
70. Buda, B.; Dylus, E.; Górską-Frączek, S.; Brzozowska, E.; Gamian, A. Właściwości biologiczne białek powierzchniowych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Postępy Hig Med Dosw.* **2013**, 67:229–37. doi: 10.5604/17322693.1043393
71. Hynönen, U.; Palva, A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2013**, 97(12):5225–43. doi:10.1007/s00253-013-4962-2
72. Goh, Y.J.; Klaenhammer, T.R. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol.* **2010**, 76(15):5005–12. doi:10.1128/aem.00030-10
73. Jankovic, I.; Ventura, M.; Meylan, V.; Rouvet, M.; Elli, M.; Zink, R. Contribution of Aggregation-Promoting Factor to Maintenance of Cell Shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J Bacteriol.* **2003**, 185(11):3288-96. doi:10.1128/jb.185.11.3288-3296.2003
74. Martinez, B.; Rodriguez, A.; Kulakauskas, S.; Chapot-Chartier, M.P. Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences. *FEMS Microbiol Rev.* **2020**, 44(5):538–64. doi:10.1093/femsre/fuaa021
75. Giordani, B.; Naldi, M.; Croatti, V.; Parolin, C.; Erdoğan, Ü.; Bartolini, M.; et al. Exopolysaccharides from vaginal lactobacilli modulate microbial biofilms. *Microb Cell Fact.* **2023**, 22:45. doi: 10.1186/s12934-023-02053-x

76. Sungur, T.; Aslim, B.; Karaaslan, C.; Aktas, B. Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). *Anaerobe*. **2017**, 47:137–44. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.05.013
77. Claesson, M.J.; Van Sinderen, D.; O'Toole, P.W. The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett*. **2007**, 269(1):22–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x
78. Choi, A.R.; Patra, J.K.; Kim, W.J.; Kang, S.S. Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Front Microbiol*. **2018**, 9:1963. doi: 10.3389/fmicb.2018.01963
79. Colautti, A.; Orecchia, E.; Comi, G.; Iacumin, L. Lactobacilli, a weapon to counteract pathogens through the inhibition of their virulence factors. *J Bacteriol*. **2022**, 204(11):e0027222. doi:10.1128/jb.00272-22
80. Huang, R.; Ning, H.; Shen, M.; Li, J.; Zhang, J.; Chen, X. Probiotics for the treatment of atopic dermatitis in children: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Cell Infect Microbiol*. **2017**, 7:392. doi:10.3389/fcimb.2017.00392
81. Zhang, Z.; Lv, J.; Pan, L.; Zhang, Y. Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2018**, 102(19):8135–43. doi:10.1007/s00253-018-9217-9
82. Ali, M.S.; Lee, E.B.; Hsu, W.H.; Suk, K.; Sayem, S.A.J.; Ullah, H.M.A.; et al. Probiotics and postbiotics as an alternative to antibiotics: an emphasis on pigs. *Pathogens*. **2023**, 12(7):874. doi:10.3390/pathogens12070874
83. Anjana.; Tiwari, S.K. Bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria in controlling dysbiosis of the gut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. **2022**, 12:851140. doi: 10.3389/fcimb.2022.851140
84. Li, H.; Miao, M.X.; Jia, C.L.; Cao, Y.B.; Yan, T.H.; Jiang, Y.Y.; et al. Interactions between *Candida albicans* and the resident microbiota. *Front Microbiol*. **2022**, 13:930495. doi:10.3389/fmicb.2022.930495
85. Hassan, M.U.; Nayab, H.; Rehman, T.U.; Williamson, M.P.; Haq, K.U.; Shafi, N.; et al. Characterisation of bacteriocins produced by *Lactobacillus* spp. isolated from the traditional pakistani yoghurt and their antimicrobial activity against common foodborne pathogens. *Biomed Res Int*. **2020**, 2020:8281623. doi: 10.1155/2020/8281623
86. Kumar, V.; Sheoran, P.; Gupta, A.; Yadav, J.P.; Tiwari, S.K. Antibacterial property of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LD4 isolated from a fermented food. *Ann Microbiol*. **2016**, 66:1431–40. doi: 10.1007/s13213-016-1230-6
87. Davies, E.A.; Bevis, H.E.; Delves-Broughton, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*. **1997**, 24(5):343–6. doi:10.1046/j.1472-765x.1997.00145.x
88. O'Reilly, C.; Grimaud, G.M.; Coakley, M.; O'Connor, P.M.; Mathur, H.; Peterson, V.L.; et al. Modulation of the gut microbiome with nisin. *Sci Reports*. **2023**, 13:7899. doi:10.1038/s41598-023-34586-x
89. Ołdak, A.; Zielińska, D. Bakteriocyyny bakterii fermentacji mlekowej jako alternatywa antybiotyków. *Postepy Hig Med Dosw*. **2017**, 71:328–38. doi:10.5604/01.3001.0010.3817
90. Jahangiri, A.; Neshani, A.; Mirhosseini, S.A.; Ghazvini, K.; Zare, H.; Sedighian, H. Synergistic effect of two antimicrobial peptides, Nisin and P10 with conventional antibiotics against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microb Pathog*. **2021**, 150:104700.

doi:10.1016/j.micpath.2020.104700

91. Strus, M.; Brzychczy-Włoch, M.; Gosiewski, T.; Kochan, P.; Heczko, P.B. The *in vitro* effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **2006**, 48(1):56–63. doi:10.1111/j.1574-695x.2006.00120.x
92. Klebanoff, S.J.; Hillier, S.L.; Eschenbach, D.A.; Waltersdorph, M. Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis.* **1991**, 164(1):94–100. doi:10.1093/infdis/164.1.94
93. Takano, T.; Kudo, H.; Eguchi, S.; Matsumoto, A.; Oka, K.; Yamasaki, Y.; et al. Inhibitory effects of vaginal *Lactobacilli* on *Candida albicans* growth, hyphal formation, biofilm development, and epithelial cell adhesion. *Front Cell Infect Microbiol.* **2023**, 13:1113401. doi:10.3389/fcimb.2023.1113401
94. Mouafo, H.T.; Sokamte, A.T.; Mbawala, A.; Ndjouenkeu, R.; Devappa, S. Biosurfactants from lactic acid bacteria: A critical review on production, extraction, structural characterization and food application. *Food Biosci.* **2022**, 46:101598. doi:10.1016/j.fbio.2022.101598
95. Bing, S.G.; Kim, J.; Reid, G.; Cadieux, P.; Howard, J.C. *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J Infect Dis.* **2002**, 185(9):1369–72. doi:10.1086/340126
96. Reid, G.; Heinemann, C.; Velraeds, M.; Van Der Mei, H.C.; Busscher, H.J. Biosurfactants produced by *Lactobacillus*. *Methods Enzymol.* **1999**, 310:426–33. doi: 10.1016/s0076-6879(99)10033-8.
97. Ji, Q.Y.; Wang, W.; Yan, H.; Qu, H.; Liu, Y.; Qian, Y.; et al. The effect of different organic acids and their combination on the cell barrier and biofilm of *Escherichia coli*. *Foods.* **2023**, 12(16):3011. doi:10.3390/foods12163011
98. Guimarães, A.; Santiago, A.; Teixeira, J.A.; Venâncio, A.; Abrunhosa, L. Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol.* **2018**, 264:31–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.025
99. Hu, C.H.; Ren, L.Q.; Zhou, Y.; Ye, B.C. Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. *Food Sci Nutr.* **2019**, 7(6):1997–2005. doi:10.1002/fsn3.1025
100. Bukhari, S.A.; Salman, M.; Numan, M.; Javed, M.R.; Zubair, M.; Mustafa, G. Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water. *Mol Biol Rep.* **2020**, 47:1871–81. doi:10.1007/S11033-020-05281-1
101. Juárez Tomás, M.S.; Saralegui Duhart, C.I.; De Gregorio, P.R.; Vera Pingitore, E.; Nader-Macías, M.E. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **2011**, 159(2):399–406. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.07.010
102. Burns, J.; McCoy, C.P.; Irwin, N.J. Synergistic activity of weak organic acids against uropathogens. *J Hosp Infect.* **2021**, 111:78–88. doi: 10.1016/j.jhin.2021.01.024
103. Ashraf, R.; Shah, N.P. Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2014**, 54(7):938–56. doi:10.1080/10408398.2011.619671
104. Karlsson, M.; Scherbak, N.; Reid, G.; Jass, J. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 enhances NF-kappaB activation in *Escherichia coli*-stimulated urinary bladder cells through TLR4. *BMC Microbiol.* **2012**, 12:15. doi:10.1186/1471-2180-12-15

105. Chen, Y.; Xu, J.; Chen, Y. Regulation of neurotransmitters by the gut microbiota and effects on cognition in neurological disorders. *Nutrients*. **2021**, 13(6):2099. doi:10.3390/nu13062099
106. Carvalho, F.M.; Teixeira-Santos, R.; Mergulhão, F.J.M.; Gomes, L.C. Effect of *Lactobacillus plantarum* biofilms on the adhesion of *Escherichia coli* to urinary tract devices. *Antibiotics*. **2021**, 10(8):966. doi:10.3390/antibiotics10080966
107. Osset, J.; Bartolomé, R.M.; García, E.; Andreu, A. Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis*. **2001**, 183(3):485–91. doi:10.1086/318070
108. Vagios, S.; Hesham, H.; Mitchell, C. Understanding the potential of lactobacilli in recurrent UTI prevention. *Microb Pathog*. **2020**, 148:104544. doi:10.1016/j.micpath.2020.104544
109. Shokri, D.; Khorasgani, M.R.; Mohkam, M.; Fatemi, S.M.; Ghasemi, Y.; Taheri-Kafrani, A. The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics Antimicrob Proteins*. **2018**, 10(1) :34–42. doi:10.1007/s12602-017-9267-9
110. Lin, X.; Chen, X.; Chen, Y.; Jiang, W.; Chen, H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Dis*. **2015**, 21(1):128–34. doi: 10.1111/odi.12257
111. Abou Elez, R.M.M.; Elsohaby, I.; Al-Mohammadi, A.R.;Seliem, M.; Tahoun, A.B.M.B.; Abousaty, A.I.; et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of probiotic *Lactobacillus plantarum* against *Listeria monocytogenes* isolated from milk, chicken and pregnant women. *Front Microbiol*. **2023**, 14:1201201. doi: 10.3389/fmicb.2023.1201201
112. Melo, T.A.; Dos Santos, T.F.; De Almeida, M.E.; Junior, L.A.G.F.; Andrade, E.F.; Rezende, R.P.; et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol*. **2016**, 16(1):250. doi:10.1186/s12866-016-0871-8
113. Ragoubi, C.; Quintieri, L.; Greco, D.; Mehrez, A.; Maatouk, I.; D’ascanio, V.; et al. Mycotoxin removal by *Lactobacillus* spp. and their application in animal liquid feed. *Toxins (Basel)*. **2021**, 13(3):185. doi:10.3390/toxins13030185
114. Khosravi Darani, K.; Zoghi, A.; Jazayeri, S.; Gomes Da Cruz, A.; Khosravi-Darani, K. Decontamination of aflatoxins with a focus on aflatoxin B1 by probiotic bacteria and yeasts: a review. *J Microbiol Biotechnol food Sci*. **2020**, 10(3):424–35. doi:10.15414/jmbfs.2020.10.3.424-435
115. Massoud, R.; Cruz, A.; Darani, K.K. Ochratoxin A: from safety aspects to prevention and remediation strategies. *Curr Nutr Food Sci*. **2018**, 14(1):11–6. doi: 10.2174/1573401313666170517165500
116. Massoud, R.; Hadiani, M.R.; Hamzehlou, P.; Khosravi-Darani, K. Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electron J Biotechnol*. **2019**, 37:56–60. doi:10.1016/j.ejbt.2018.11.003
117. Zoghi, A.; Khosravi-Darani, K.; Sohrabvandi, S. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini Rev Med Chem*. **2014**, 14(1):84–98. doi:10.2174/1389557513666131211105554
118. Zoghi, A.; Massoud, R.; Todorov, S.D.; Chikindas, M.L.; Popov, I.; Smith, S.; et al. Role of the lactobacilli in food bio-decontamination: Friends with benefits. *Enzyme Microb Technol*. **2021**, 150:109861. doi:10.1016/j.enzmictec.2021.109861
119. Whiteside, S.A.; Razvi, H.; Dave, S.; Reid, G.; Burton, J.P. The microbiome of the urinary tract--a role beyond infection. *Nat Rev Urol*. **2015**, 12(2):81–90. doi:10.1038/nrurol.2014.361

120. Johnson, J.A.; Delaney, L.F.; Ojha, V.; Rudraraju, M.; Hintze, K.R.; Siddiqui, N.Y.; et al. Commensal urinary Lactobacilli inhibit major uropathogens in vitro with heterogeneity at species and strain level. *Front Cell Infect Microbiol.* **2022**, 12:870603. doi: 10.3389/fcimb.2022.870603
121. Jayalath, S.; Magana-Arachchi, D. Dysbiosis of the human urinary microbiome and its association to diseases affecting the urinary system. *Indian J Microbiol.* **2022**, 62(2):153–66. doi:10.1007/s12088-021-00991-x
122. Mulder, M.; Radjabzadeh, D.; Hassing, R.J.; Heeringa, J.; Uitterlinden, A.G.; Kraaij, R.; et al. The effect of antimicrobial drug use on the composition of the genitourinary microbiota in an elderly population. *BMC Microbiol.* **2019**, 19(1):9. doi: 10.1186/s12866-018-1379-1
123. Cepnja, M.; Oros, D.; Melvan, E.; Svetlicic, E.; Skrlin, J.; Barisic, K.; et al. Modeling of urinary microbiota associated with cystitis. *Front Cell Infect Microbiol.* **2021**, 11:643638. doi: 10.3389/fcimb.2021.643638
124. Choi, H.W.; Lee, K.W.; Kim, Y.H. Microbiome in urological diseases: Axis crosstalk and bladder disorders. *Investig Clin Urol.* **2023**, 64(2):126-39. doi:10.4111/icu.20220357
125. Wu, P.; Zhang, G.; Zhao, J.; Chen, J.; Chen, Y.; Huang, W.; et al. Profiling the urinary Microbiota in male patients with bladder cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol.* **2018**, 8:167. doi:10.3389/fcimb.2018.00167
126. Lemberger, U.; Pjevac, P.; Hausmann, B.; Berry, D.; Moser, D.; Jahrreis, V.; et al. The microbiome of kidney stones and urine of patients with nephrolithiasis. *Urolithiasis.* **2023**, 51(1):27. doi:10.1007/S00240-022-01403-5
127. Barr-Beare, E.; Saxena, V.; Hilt, E.E.; Thomas-White, K.; Schober, M.; Li, B.; et al. The interaction between Enterobacteriaceae and calcium oxalate deposits. *PLoS One.* **2015**, 10(10):e0139575. doi:10.1371/journal.pone.0139575
128. Fraga, M.; Scavone, P.; Zunino, P. Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model. *Antonie van Leeuwenhoek.* **2005**, 88(1):25–34. doi:10.1007/s10482-004-5475-x
129. Reid, G.; Bruce, A.; Taylor, M. Influence of three-day antimicrobial therapy and lactobacillus vaginal suppositories on recurrence of urinary tract infections. *Clin Ther.* **1992**, 14(1):11-6.
130. Ferrara, P.; Romaniello, L.; Vitelli, O.; Gatto, A.; Serva, M.; Cataldi, L. Cranberry juice for the prevention of recurrent urinary tract infections: a randomized controlled trial in children. *Scand J Urol Nephrol.* **2009**, 43(5):369–72. doi:10.3109/00365590902936698
131. Kontiokari, T.; Sundqvist, K.; Nuutinen, M.; Pokka, T.; Koskela, M.; Uhari, M. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and *Lactobacillus* GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ.* **2001**, 322(7302):1571. doi:10.1136/bmj.322.7302.1571
132. Swidsinski, A.; Loening-Baucke, V.; Mendling, W.; Swidsinski, S. Positive effects of local therapy with a vaginal lactic acid gel on dysuria and *E.coli* bacteriuria question our current views on recurrent cystitis. *Arch Gynecol Obstet.* **2012**, 285(6):1619–25. doi:10.1007/S00404-011-2196-z
133. Diebold, R.; Schopf, B.; Stammer, H.; Mendling, W. Vaginal treatment with lactic acid gel delays relapses in recurrent urinary tract infections: results from an open, multicentre observational study. *Arch Gynecol Obstet.* **2021**, 304(2):409-417. doi:10.1007/s00404-021-06040-8
134. Friedrich, V.; Choi, H.W. The urinary microbiome: role in bladder cancer and treatment. *Diagnostics (Basel).* **2022**, 12(9):2068. doi:10.3390/diagnostics12092068

135. Akgül, T.; Karakan, T. The role of probiotics in women with recurrent urinary tract infections. *Turkish J Urol.* **2018**, 44(5):377-383. doi:10.5152/tud.2018.48742
136. Aragón, I.M.; Herrera-Imbroda, B.; Queipo-Ortuño, M.I.; Castillo, E.; Del Moral, J.S.G.; Gómez-Millán, J.; et al. The urinary tract microbiome in health and disease. *Eur Urol Focus.* **2018**, 4(1):128–38. doi: 10.1016/j.euf.2016.11.001
137. Watson, R.A. Enlisting probiotics to combat recurrent urinary tract infections in women—A military strategy for meeting the challenge. *Antibiotics.* **2023**, 12(1):167. doi:10.3390/antibiotics12010167
138. Forster, C.S.; Hsieh, M.H.; Pérez-Losada, M.; Caldovic, L.; Pohl, H.; Ljungberg, I.; et al. A single intravesical instillation of *Lactobacillus rhamnosus* GG is safe in children and adults with neuropathic bladder: A phase Ia clinical trial. *J Spinal Cord Med.* **2021**, 44(1):62–9. doi:10.1080/10790268.2019.1616456
139. Kwon, M.; Lee, J.; Park, S.; Kwon, O.H.; Seo, J.; Roh, S. Exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* L-14 has anti-inflammatory effects via the Toll-Like Receptor 4 pathway in LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *Int J Mol Sci.* **2020**, 21(23):9283. doi:10.3390/ijms21239283
140. Ambalam, P.S.; Prajapati, J.B.; Dave, J.M.; Nair, B.M.; Ljungh, Å.; Vyas, B.R.M. Isolation and characterization of antimicrobial proteins produced by a potential probiotic strain of human *Lactobacillus rhamnosus* 231 and its effect on selected human pathogens and food spoilage organisms. *Microb Ecol Health Dis.* **2009**, 21(3-4):211–20. doi:10.3109/08910600903429052
141. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem.* **1956**, 28(3):350–6. doi: 10.1021/ac60111a017
142. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **1951**, 193(1):265–75.
143. Griffith, D.P.; Musher, D.M.; Itin, C. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. *Invest Urol.* **1976**, 13(5):346–50.
144. Dertli, E.; Mayer, M.J.; Narbad, A. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *BMC Microbiol.* **2015**, 15:8. doi:10.1186/s12866-015-0347-2/
145. Mlugu, E.M.; Mohamedi, J.A.; Sangeda, R.Z.; Mwambete, K.D. Prevalence of urinary tract infection and antimicrobial resistance patterns of uropathogens with biofilm forming capacity among outpatients in morogoro, Tanzania: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* **2023**, 23:660. doi:10.1186/s12879-023-08641-x
146. Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Marra, M.; Zummo, S.; Biondo, C. Urinary tract infections: The current scenario and future prospects. *Pathogens.* **2023**, 12(4):623. doi:10.3390/pathogens12040623
147. Hsiao, C.Y.; Yang, H.Y.; Chang, C.H.; Lin, H.L.; Wu, C.Y.; Hsiao, M.C.; et al. Risk factors for development of septic shock in patients with urinary tract infection. *Biomed Res Int.* **2015**, 2015:717094. doi:10.1155/2015/717094
148. Khusid, J.A.; Hordines, J.C.; Sadiq, A.S.; Atallah, W.M.; Gupta, M. Prevention and management of infectious complications of retrograde intrarenal surgery. *Front Surg.* **2021**, 8:718583. doi:10.3389/fsurg.2021.718583
149. Torzewska, A.; Wiewiura, P.; Brodecka, D.; Szczerbic, D.; Różalski, A. Potentially probiotic *Lactobacillus* strains derived from food intensify crystallization caused by *Proteus*

- mirabilis* in urine. *Probiotics Antimicrob Proteins*. **2021**,13(2):441–52. doi:10.1007/s12602-020-09689-w
150. Argentini, C.; Fontana, F.; Alessandri, G.; Lugli, G.A.; Mancabelli, L.; Ossiprandi, M.C.; et al. Evaluation of modulatory activities of *Lactobacillus crispatus* strains in the context of the vaginal microbiota. *Microbiol Spectr*. **2022**, 10(2):e0273321. doi:10.1128/spectrum.02733-21
 151. Bungenstock, L.; Abdulmawjood, A.; Reich, F. Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS One*. **2020**, 15(3):e0230345. doi:10.1371/journal.pone.0230345
 152. Fusco, A.; Savio, V.; Chiaromonte, A.; Alfano, A.; D'Ambrosio, S.; Cimini, D.; et al. Evaluation of different activity of *Lactobacillus* spp. against two *Proteus mirabilis* isolated clinical strains in different anatomical sites *in vitro*: An explorative study to improve the therapeutic approach. *Microorganisms* **2023**, 11(9):2201. doi:10.3390/microorganisms11092201
 153. Shaaban, M.; El-Rahman, O.A.A.; Al-Qaidi, B.; Ashour, H.M. Antimicrobial and antibiofilm activities of probiotic lactobacilli on antibiotic-resistant *Proteus mirabilis*. *Microorganisms*. **2020**, 8(6):960. doi:10.3390/microorganisms8060960
 154. Salman, M.; Tariq, A.; Ijaz, A.; Naheed, S.; Hashem, A.; Abd-Allah, E.F.; et al. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of *Lactobacillus coryniformis* BCH-4 bioactive compounds and determination of their bioprotective effects on nutritional components of maize (*Zea mays* L.). *Molecules*. **2020**, 25(20):4685. doi:10.3390/molecules25204685
 155. Punia Bangar, S.; Suri, S.; Trif, M.; Ozogul, F. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Biosci*. **2022**, 46:101615. doi: 10.1016/j.fbio.2022.101615
 156. Chung, Y.; Kang, S.B.; Son, D.; Lee, J.Y.; Chung, M.J.; Lim, S. Characterization of the probiotic properties of *Lactocaseibacillus rhamnosus* LR6 isolated from the vaginas of healthy Korean women against vaginal pathogens. *Front Microbiol*. **2023**,14:1308293. doi: 10.3389/fmicb.2023.1308293
 157. Boskey, E.R.; Cone, R.A.; Whaley, K.J.; Moench, T.R. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod*. **2001**, 16(9):1809–13. doi:10.1093/humrep/16.9.1809
 158. Boterberg, S.; Vantroys, E.; de Paepe, B.; van Coster, R.; Roeyers, H. Urine lactate concentration as a non-invasive screener for metabolic abnormalities: findings in children with autism spectrum disorder and regression. *PLoS One*. **2022**, 17(9):e0274310. doi:10.1371/journal.pone.0274310
 159. Amrutha, B.; Sundar, K.; Shetty, P.H. Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microb Pathog*. **2017**, 111:156–62. doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.042
 160. Jacobsen, S.M.; Stickler, D.J.; Mobley, H.L.T.; Shirtliff, M.E. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*. **2008**, 21(1):26–59. doi:10.1128/CMR.00019-07
 161. Petrova, M.I.; Macklaim, J.M.; Wuyts, S.; Verhoeven, T.; Vanderleyden, J.; Gloor, G.B.; et al. Comparative genomic and phenotypic analysis of the vaginal probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1. *Front Microbiol*. **2018**, 9:1278. doi:10.3389/fmicb.2018.01278
 162. York, N.E.; Borofsky, M.S.; Lingeman, J.E. Risks associated with drug treatments for kidney stones. *Expert Opin Drug Saf*. **2015**, 14(12):1865–77. doi:10.1517/14740338.2015.1100604

163. Milo, S.; Heylen, R.A.; Glancy, J.; Williams, G.T.; Patenall, B.L.; Hathaway, H.J.; et al. A small-molecular inhibitor against *Proteus mirabilis* urease to treat catheter-associated urinary tract infections. *Sci Reports*. **2021**, 11:3726. doi:10.1038/s41598-021-83257-2
164. Li, W.Y.; Ni, W.W.; Ye, Y.X.; Fang, H.L.; Pan, X.M.; He, J.L.; et al. N-monoarylacetoithiureas as potent urease inhibitors: synthesis, SAR, and biological evaluation. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **2020**, 35(1):404–13. doi:10.1080/14756366.2019.1706503
165. Banerjee, P.; Merkel, G.J.; Bhunia, A.K. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus B-30892 can inhibit cytotoxic effects and adhesion of pathogenic *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *Gut Pathog*. **2009**, 1(1):8. doi:10.1186/1757-4749-1-8
166. Maudsdotter, L.; Jonsson, H.; Roos, S.; Jonsson, A.B. Lactobacilli reduce cell cytotoxicity caused by *Streptococcus pyogenes* by producing lactic acid that degrades the toxic component lipoteichoic acid. *Antimicrob Agents Chemother*. **2011**, 55(4):1622-28. doi:10.1128/aac.00770-10
167. Plummer, E.L.; Bradshaw, C.S.; Doyle, M.; Fairley, C.K.; Murray, G.L.; Bateson, D.; et al. Lactic acid-containing products for bacterial vaginosis and their impact on the vaginal microbiota: A systematic review. *PLoS One*. **2021**, 16(2):e0246953. doi:10.1371/journal.pone.0246953
168. Witkin, S.S.; Mendes-Soares, H.; Linhares, I.M.; Jayaram, A.; Ledger, W.J.; Forney, L.J. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *MBio*. **2014**, 5(10):1128. doi:10.1128/mBio.00460-13
169. Chaiyarit, S.; Thongboonkerd, V. Defining and systematic analyses of aggregation indices to evaluate degree of calcium oxalate crystal aggregation. *Front Chem*. **2017**, 5:113. doi:10.3389/fchem.2017.00113
170. Astasov-Frauenhoffer, M.; Varenganayil, M.M.; Decho, A.W.; Waltimo, T.; Braissant, O. Exopolysaccharides regulate calcium flow in cariogenic biofilms. *PLoS One*. **2017**, 12(10):e0186256. doi:10.1371/journal.pone.0186256
171. Prywer, J.; Torzewska, A. Impact of bacteria on aggregation of crystalline and amorphous components of infectious urinary stones. *J Cryst Growth*. **2019**, 506:71–8. doi:10.1016/j.crysgro.2018.10.018
172. Ou, Y.; Xue, J.F.; Tan, C.Y.; Gui, B.S.; Sun, X.Y.; Ouyang, J.M. Inhibition of urinary macromolecule heparin on aggregation of nano-COM and nano-COD Crystals. *Molecules* **2015**, 20(1):1626–42. doi:10.3390/molecules20011626

X. Oświadczenia współautorów

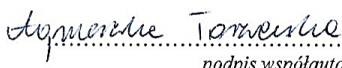
Oświadczenie współautorów o udziale w publikacji

Organic Acids Secreted by Lactobacillus spp. Isolated from Urine and Their Antimicrobial Activity against Uropathogenic Proteus mirabilis

Dominika Szczerbiec, Justyna Piechocka, Rafał Głowacki, Agnieszka Torzewska

Molecules 2022, 27, 5557 (DOI:10.3390/molecules27175557)

Autor	Szacunkowy udział [%]	Opis działań
mgr Dominika Szczerbiec	60	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - współudział w przygotowaniu koncepcji pracy - planowanie i przeprowadzenie badań eksperymentalnych z zakresu: izolacji szczepów <i>Lactobacillus</i> z moczu, oceny właściwości przeciwbakteryjnych szczepów <i>Lactobacillus</i> wobec badanych szczepów <i>P. mirabilis</i>, oznaczania ilościowego kwasu mlekowego, wytwarzanego przez badane szczepy <i>Lactobacillus</i>, metodą spektrofotometryczną, oceny działania kwasów organicznych na wzrost <i>P. mirabilis</i> i tworzenia biofilmu, oceny wpływu kwasów organicznych na błonę komórkową <i>P. mirabilis</i> - analizę i interpretację wyników ww. badań eksperymentalnych - przygotowanie wizualizacji ww. wyników - współudział w przygotowaniu manuskryptu podpis współautora
dr Justyna Piechocka	15	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - planowanie i przeprowadzanie badań eksperymentalnych z zakresu oznaczenia jakościowego oraz ilościowego kwasu cytrynowego i bursztynowego, wytwarzanych przez badane szczepy <i>Lactobacillus</i>, za pomocą techniki LC-MS/MS - przygotowanie wizualizacji ww. wyników - przygotowanie opisu metody ww. badań do manuskryptu podpis współautora

prof. dr hab. Rafał Głowacki	5	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: planowanie badań eksperymentalnych i metodyki z zakresu oznaczenia jakościowego oraz ilościowego kwasu cytrynowego i bursztynowego, wytwarzanych przez badane szczepy <i>Lactobacillus</i>, za pomocą techniki LC-MS/MS  podpis współautora
dr hab. Agnieszka Torzewska, prof. UŁ	20	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - współudział w przygotowaniu koncepcji pracy - nadzór nad realizacją badań - współudział w interpretacji wyników - współudział w przygotowaniu i edycji manuskryptu - pełnienie roli autora korespondującego  podpis współautora

Oświadczenie współautorów o udziale w publikacji

Antibacterial properties and urease suppresion ability of Lactobacillus inhibit the development of infectious urinary stones caused by Proteus mirabilis

Dominika Szczerbiec, Katarzyna Bednarska-Szczepaniak, Agnieszka Torzewska

Scientific Reports 2024, 14, 943 (DOI:10.1038/s41598-024-51323-0)

Autor	Szacunkowy udział [%]	Opis działań
mgr Dominika Szczerbiec	65	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - współudział w przygotowaniu koncepcji pracy - planowanie i przeprowadzenie badań eksperymentalnych z zakresu: oceny wpływu szczepów <i>Lactobacillus</i> na krystalizację indukowaną <i>P. mirabilis</i>, oceny wpływu <i>Lactobacillus</i> oraz kwasu mlekowego na aktywność ureazy, badań kinetyki reakcji enzymatycznej - analizę i interpretację wyników ww. badań eksperymentalnych - przygotowanie wizualizacji ww. wyników - współudział w przygotowaniu manuskryptu podpis współautora
dr Katarzyna Bednarska-Szczepaniak	15	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - planowanie i przeprowadzanie badań <i>in silico</i> modelowania homologicznego białek oraz dokowania molekularnego - analizę i współudział w interpretacji ww. wyników - przygotowanie wizualizacji ww. wyników - przygotowanie opisu metod ww. badań do manuskryptu podpis współautora

dr hab. Agnieszka Torzewska, prof. UŁ	20	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: • współudział w przygotowaniu koncepcji pracy • nadzór nad realizacją badań • współudział w interpretacji wyników • współudział w przygotowaniu i edycji manuskryptu • pełnienie roli autora korespondującego <i>Agnieszka Torzewska</i>..... podpis współautora
--	----	--

Oświadczenie współautorów o udziale w publikacji

Substances Secreted by Lactobacillus spp. from the Urinary Tract Microbiota Play a Protective Role against Proteus mirabilis Infections and Their Complications

Dominika Szczerbiec, Mirosława Słaba, Agnieszka Torzewska

International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 103 (DOI:10.3390/ijms25010103)

Autor	Szacunkowy udział [%]	Opis działań
mgr Dominika Szczerbiec	70	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - współudział w przygotowaniu koncepcji pracy - planowanie i przeprowadzenie badań eksperymentalnych z zakresu: oceny wpływu substancji zewnątrzkomórkowych <i>Lactobacillus</i> na adhezję <i>P. mirabilis</i> do nabłonka pęcherza moczowego, oceny cytotoksyczności indukowaną <i>P. mirabilis</i> wobec komórek HCV-29, oceny wpływu substancji zewnątrzkomórkowych <i>Lactobacillus</i> na krystalizację indukowaną <i>P. mirabilis</i> oraz obrazowania mikroskopowego (Barwienie Von Kossa, autofluorescencja kryształów) - analizę i interpretację wyników ww. badań eksperymentalnych - przygotowanie wizualizacji ww. wyników - współudział w przygotowaniu manuskryptu podpis współautora
dr hab. Mirosława Słaba, prof. UŁ	10	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - planowanie i przeprowadzanie badań eksperymentalnych z zakresu oznaczania stężenia jonów wapnia i magnezu w badanych próbach za pomocą metody AAS - przygotowanie opisu metod ww. badań do manuskryptu podpis współautora

dr hab. Agnieszka Torzewska, prof. UŁ	20	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: • współudział w przygotowaniu koncepcji pracy • nadzór nad realizacją badań • współudział w interpretacji wyników • współudział w przygotowaniu i edycji manuskryptu • pełnienie roli autora korespondującego <i>Agnieszka Torzewska</i> <i>podpis współautora</i>
--	----	---