ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ ИЗОЛИРОВАННЫМИ ИЗ ЗУБНОГО КАМНЯ

Выполнил: Хасанова Надия Сагитовна
Направление подготовки
06.04.01 Биология
направленность (профиль)
образовательной программы
Фундаментальная прикладная
микробиология

Руководитель: Баймиев Алексей Ханифович, д.б.н., профессор кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии

Выпускная квалификационная работа допущена к защите
«_____»
«17» 06 2025 г.

Выпускная квалификационная работа защищена с оценкой
«отлично»
«24» 06 2025 г.

Уфа – 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 6
1.1. Биоплёнки: определение, строение и значение в микробиологии 6
1.2. Микробиота полости рта и её роль в патогенезе 18
1.3. Устойчивость биоплёнок к антимикробным воздействиям 24
1.4. Методы исследования биоплёнок и их состава 31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 1
2.1. Объекты исследования 43
2.2. Методы выделения, культивирования и оценки биоплёнообразования бактерий, изолированных из зубных камней 44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 51
3.1. Морфологическая и колониальная характеристика выделенных видов 51
3.2. Способность изолятов к образованию биоплёнок на различных субстратах 53
3.4. Идентификация доминирующих видов в структуре биоплёнок 60
3.5. Сравнительный анализ биоплёночной активности разных изолятов 64
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 68
ВЫВОДЫ 71
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 72
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 74

ВВЕДЕНИЕ

Современная микробиология уделяет значительное внимание изучению биоплёночных форм существования микроорганизмов, поскольку именно в этом состоянии подавляющее большинство бактерий проявляет высокую степень устойчивости к внешним воздействиям и играет ключевую роль в развитии хронических инфекций. Биоплёнки представляют собой сложные микробные сообщества, погружённые в матрикс внеклеточных полимерных веществ, что обеспечивает их выживание в неблагоприятных условиях и эффективную межклеточную коммуникацию.

Одной из клинически значимых моделей естественного образования биоплёнок является микробиота полости рта человека, в частности, зубной налёт и зубной камень. Эти структуры служат примером стабильных микробных сообществ, формирующихся на твёрдых поверхностях и играющих важную роль в патогенезе таких заболеваний, как кариес, гингивит и пародонтит. Зубной камень, как минерализованный продукт зубного налёта, представляет особый интерес для микробиологических исследований, поскольку в его составе сохраняются жизнеспособные бактерии, обладающие способностью к повторному формированию биоплёнок.

Изучение биоплёнок, выделенных из зубных камней, имеет важное значение не только для понимания механизмов устойчивости микробных сообществ к антимикробной терапии, но и для разработки эффективных методов профилактики и лечения стоматологических заболеваний. Несмотря на активные исследования в области микробиоты полости рта, остаётся ряд нерешённых вопросов, касающихся морфологических и функциональных особенностей бактерий, выделяемых из зубного камня, их способности к биоплёночной организации in vitro, межвидовых взаимодействий, а также уровней устойчивости к антибиотикам.

Актуальность настоящего исследования обусловлена необходимостью углублённого изучения биоплёночных свойств микроорганизмов,

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биоплёнки: определение, строение и значение в микробиологии

История исследования биоплёнок относительно молода. Важным этапом в её развитии стали работы Listgarten и его коллег, которые в 1975 году с использованием световой и электронной микроскопии провели детальное изучение структуры оральных биоплёнок. Одним из ключевых открытий стало описание электронно-плотного дольчатого кутикулярного слоя, покрывающего поверхность зуба. Было установлено, что микробная биоплёнка на поверхности здорового зуба характеризуется тонким слоем бактерий, представленных преимущественно кокковидными формами с морфологическими признаками, типичными для грамположительных микроорганизмов. В области апикальной части эмали встречались отдельные нитевидные и ветвящиеся формы бактерий, а также единичные грамотрицательные клетки [11].

В случае гингивита наблюдалось усложнение структуры наддесневой биоплёнки, которая включала большое количество нитчатых форм, грамотрицательных бактерий, а также характерные морфологические элементы – образования типа «кукурузных початков» и присутствие жгутиковых клеток со спирохетами. Биоплёнка при пародонтите демонстрировала схожие характеристики с таковой при гингивите, однако поддесневая микробиота отличалась уменьшением количества прикорневых клеток и увеличением доли грамотрицательных, жгутиковых микроорганизмов и спирохет среднего размера.

При пародонтозе микробная биоплёнка была менее выраженной и представлена преимущественно грамотрицательными бактериями, что свидетельствует о снижении микробного разнообразия в условиях данного патологического процесса.

Таким образом, исследования Listgarten заложили основы для понимания морфологической и микробиологической структуры оральных биоплёнок как в норме, так и при различных формах воспалительных заболеваний пародонта.

В ряде прикладных исследований, проведённых Koo и соавт., были выявлены существенные различия в характеристиках биоплёнок у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом по сравнению со здоровыми индивидуумами. Анализ микробных сообществ в различных биотопах полости рта у больных продемонстрировал выраженный микробиологический дисбаланс, проявляющийся в снижении уровня нормобиоты и увеличении численности условно-патогенных микроорганизмов [30].

Кроме того, было установлено, что микробиота полости рта пациентов с хроническим пародонтитом характеризуется значительно повышенной адгезивной способностью по отношению к клеткам слизистой оболочки, по сравнению с микрофлорой здоровых лиц. Существенные изменения были зафиксированы и в метаболической активности микроорганизмов, в частности, в их газообменных процессах: стрептококки и стафилококки у пациентов с данным заболеванием продуцировали большее количество оксида углерода (CO) и сниженное количество оксида азота (NO). Эти особенности метаболизма могут служить важными диагностическими маркерами и ориентиром для выбора оптимальной терапевтической стратегии.

Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях в процессах биоплёнообразования у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом, что подчёркивает сложность и многоуровневость патогенеза данного заболевания. При этом следует отметить, что в доступной научной литературе отсутствуют детальные описания механизмов развития подобных патологических изменений, что

актуализирует необходимость проведения дальнейших практических исследований в данной области [30].

Список микроорганизмов, относимых к категории «предполагаемых пародонтальных патогенов», на протяжении последних десятилетий существенно расширился. В частности, в систематическом обзоре Perez-Chaparro были выделены 17 видов бактерий, ассоциированных с развитием пародонтита. Эти микроорганизмы принадлежат к различным таксономическим группам, включая типы *Bacteroidetes, Candidatus Saccharibacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes и Synergistetes* [39].

С течением времени перечень потенциальных пародонтопатогенов продолжил увеличиваться, что отражает углубление знаний о микробной экологии полости рта. Однако, несмотря на накопление информации о видовом разнообразии, роль многих из этих микроорганизмов в патогенезе пародонтита остаётся недостаточно изученной и требует дальнейшего уточнения [40].

Предполагается, что вклад отдельных бактерий в прогрессирование заболеваний пародонта может быть неодинаковым. Тем не менее, точная оценка патогенетической значимости каждого вида возможна лишь на основе долгосрочных проспективных исследований без вмешательства, которые позволили бы проследить естественное течение болезни. На сегодняшний день подобные исследования являются редкостью, что затрудняет формирование окончательных выводов о роли конкретных микробных агентов в развитии и хронизации воспалительных процессов в тканях пародонта.

Пародонтит представляет собой сложное мультифакторное воспалительное заболевание, возникающее вследствие длительного хронического воздействия полимикробного сообщества, локализованного в десневых или пародонтальных карманах. Патогенез данного процесса характеризуется чередованием фаз деструкции и репарации тканей, что в

конечном итоге приводит к необратимой потере прикрепления мягких тканей к альвеолярной кости.

Одним из ключевых звеньев в развитии пародонтита является не только изменение состава микробиоты полости рта и пародонта, но и нарушение механизма формирования биоплёнок. В нормальных физиологических условиях процесс биопленкообразования включает три основных этапа.

Первый этап – адгезия, при котором микроорганизмы прикрепляются к поверхности (например, к поверхности зуба или эпителию десны), создавая первичную микробную колонию. Вторым этапом является созревание биоплёнки, когда происходит активное размножение бактерий с одновременной выработкой внеклеточного полимерного матрикса (ЭПМ), который обеспечивает защиту и структурную стабильность биоплёнки. На этом этапе формируется зрелое микробное сообщество с упорядоченной архитектурой и сложными межбактериальными взаимодействиями [39]/

Заключительным этапом является дисперсия, в ходе которой часть бактерий высвобождается из биоплёнки и распространяется в окружающую среду, инициируя колонизацию новых поверхностей и образование вторичных биоплёнок. Этот процесс играет важную роль в адаптации и выживании микроорганизмов, способствуя их распространению и поддержанию хронического воспалительного процесса в тканях пародонта.

Для патогенных микроорганизмов процесс диспергирования биоплёнок играет важную роль в распространении инфекции, поскольку отделяющиеся от матрикса бактерии способны колонизировать новые поверхности и инициировать развитие воспалительных процессов. В то же время синтез внеклеточного полимерного матрикса значительно повышает устойчивость бактерий, находящихся в составе биоплёнки, к факторам иммунной защиты организма и антимикробным препаратам. В отличие от защищённых структурой биоплёнки микроорганизмов, планктонные (свободно

плавающие) бактерии более уязвимы, поскольку утрачивают преимущества, связанные с коллективной защитой.

Формирование биоплёнки в полости рта представляет собой многоэтапный процесс, в котором последовательно участвуют различные виды микроорганизмов. На начальной стадии основную роль играют бактерии рода *Streptococcus*, такие как *Streptococcus oralis, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus gordonii* и *Streptococcus sanguis*. Эти микроорганизмы выступают первичными колонизаторами наддесневой поверхности зуба благодаря высокой способности к адгезии.

В дальнейшем к ним присоединяются поздние колонизаторы, среди которых выделяют *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia, Treponema denticola* и другие анаэробные патогены. Эти бактерии заселяют поддесневые пространства и нередко принимают участие в развитии воспалительных процессов, включая пародонтит.

Промежуточное звено в формировании зрелой биоплёнки занимают такие микроорганизмы, как *Fusobacterium nucleatum*, которые обеспечивают коагрегацию между ранними и поздними колонизаторами. Эти виды способствуют созданию прочной структуры биоплёнки и усилению межбактериальных взаимодействий, что повышает устойчивость микробного сообщества и его способность к длительному существованию в неблагоприятных условиях [37].

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ранее известный как *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) представляет собой факультативно-анаэробную палочковидную бактерию, обитающую в полости рта человека. Этот микроорганизм обладает выраженной способностью к формированию устойчивых биоплёнок на поверхности зубного налёта. Биоплёнка, образуемая данным видом, характеризуется прочным прикреплением к субстрату и высокой устойчивостью к воздействию ультразвука, моющих средств и других физических или химических факторов.

Результаты исследований, проведённых в условиях in vitro, продемонстрировали, что бактерии *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, находящиеся в составе биоплёнки, значительно менее чувствительны к бактерицидному действию средств для полоскания рта по сравнению с их планктонной (свободноживущей) формой. Эта особенность объясняет ограниченную эффективность традиционных методов пародонтологической терапии при борьбе с инфекциями, обусловленными данным микроорганизмом.

Стойкость биоплёночных форм *A. actinomycetemcomitans* к антимикробным воздействиям создаёт серьёзные затруднения в процессе лечения заболеваний пародонта, поскольку стандартные подходы, направленные на устранение бактериальной инфекции, оказываются недостаточными для полного удаления патогена. Это подчёркивает необходимость разработки новых терапевтических стратегий, ориентированных на разрушение структуры биоплёнки и повышение доступности бактерий для антимикробных препаратов [35].

Было установлено, что *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ныне *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) играет ключевую роль в развитии локализованных форм заболеваний пародонта, особенно у молодых людей. Это открытие подтвердило гипотезу о том, что определённые виды микроорганизмов обладают более значимым патогенетическим потенциалом в прогрессировании пародонтальных заболеваний по сравнению с другими представителями микробной флоры. В связи с этим такие микроорганизмы были выделены в категорию так называемых «предполагаемых пародонтальных патогенов».

Биоплёнка, формируемая *A. actinomycetemcomitans*, окружена специализированным внеклеточным матриксом, который играет важную роль в обеспечении её структурной целостности и защитных функций. В состав этого матрикса входят фимбрии типа IV, внеклеточная ДНК, а также

экзополисахариды, основным компонентом которых является панкреатический гидролизат казеина [40].

Особое значение имеет фермент дисперсин В – полисахаридгидролаза, секретируемая *A. actinomycetemcomitans*. Этот фермент, активируемый N-ацетилглюкозамином, регулирует процессы прикрепления бактерий к поверхности и способствует межклеточной агрегации в пределах биоплёнки. Дисперсин В является важным элементом внеклеточного матрикса, обеспечивающим устойчивость бактериального сообщества к действию антибиотиков и защитным механизмам организма, включая фагоцитоз.

В зрелых биоплёнках экзополисахариды составляют основной объем внеклеточного матрикса, достигая более 90% от общего объема всей структуры. Этот полимерный каркас играет ключевую роль в защите микроорганизмов, обеспечивая устойчивость биоплёнки к внешним воздействиям и антимикробным агентам.

Фермент дисперсин В, обладающий активностью β-гексозидазы, расщепляет компоненты экзополисахаридного матрикса, в частности панкреатический гидролизат казеина. В результате этого процесса в структуре биоплёнки формируются участки, лишённые полисахаридов, что приводит к ослаблению целостности биоплёнки и инициирует её дисперсию.

Дисперсия зрелой биоплёнки способствует выходу микроорганизмов в окружающую среду, что, в свою очередь, активизирует условно-патогенную микрофлору и запускает воспалительную реакцию. Данный процесс лежит в основе развития локального инфекционного очага, который при отсутствии адекватного иммунного ответа или своевременной терапии может привести к генерализации инфекционного процесса и распространению патогенных агентов за пределы первичного очага воспаления [39].

Ранее уже отмечалась определённая последовательность в процессе формирования биоплёнок, которая включает этапы поэтапной колонизации различных групп микроорганизмов. Первичными колонизаторами являются аэробные бактерии, такие как *Actinomyces* spp., *Streptococcus oralis,*

Streptococcus intermedius, обеспечивающие начальную адгезию к поверхности зуба. Следующим звеном в созревании биоплёнки становится присоединение анаэробных микроорганизмов, среди которых ключевую роль играет *Fusobacterium nucleatum*, выполняющий функцию «моста» между ранними и поздними колонизаторами. Завершающий этап характеризуется включением в биоплёночную структуру строгих анаэробов, таких как *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia* и других патогенных представителей.

Данный сложный процесс сопровождается активным синтезом факторов адгезии и межбактериальной коммуникации, включая специфические белки-адгезины, аутоиндукторы первого и второго порядка, сигнальные молекулы и олигосахариды. Например, оральный комменсал Streptococcus gordonii синтезирует белки Ag I/II (известные как SpaP и SspA), которые способствуют усилению фиксации в биоплёнке таких патогенов, как *P. gingivalis.*

Интерес вызывает влияние этих молекулярных взаимодействий на патогенез заболеваний полости рта. Установлено, что сдвиг микробного баланса биоплёнки в сторону преобладания условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (дисбиоз) играет ключевую роль в развитии воспалительных заболеваний, включая пародонтит и кариес. Несмотря на признанную полимикробную природу пародонтита, многие исследователи выделяют *P. gingivalis* как основной фактор, инициирующий воспалительный процесс.

Особое значение придают экспрессии фимбрий типов II и IV у *P. gingivalis*, которые обеспечивают повышенную способность бактерии к адгезии и инвазии тканей пародонта. Эти свойства были подтверждены в ходе экспериментов по культивированию изолятов, выделенных у пациентов с хроническим пародонтитом, на питательных средах и клетках эпителия десны человека. Таким образом, межбактериальные взаимодействия и экспрессия факторов вирулентности играют решающую роль в

трансформации нормальной микробиоты в патогенную биоплёнку, способствующую развитию воспалительных заболеваний полости рта [39].

Разнообразные микроорганизмы в составе биоплёнок часто осуществляют координацию своей деятельности посредством механизма quorum sensing (QS) – системы межклеточной коммуникации, основанной на высвобождении и восприятии низкомолекулярных сигнальных соединений, известных как аутоиндукторы. Этот процесс позволяет микробным сообществам синхронизировать экспрессию генов, включая гены, ответственные за синтез факторов вирулентности, в зависимости от плотности популяции.

По мере увеличения числа клеток концентрация аутоиндукторов в окружающей среде возрастает, что приводит к активации специфических регуляторных путей, запускающих изменения в генетической активности, зависящие как от плотности клеток, так и от стадии их роста. Таким образом, quorum sensing обеспечивает микробным сообществам возможность адаптироваться к условиям среды, инициировать коллективное поведение, включая формирование и поддержание биоплёнок, выработку токсинов, ферментов и других факторов патогенности [31].

Следует отметить, что синтез молекул аутоиндукторов, в частности олигопептидов, представляет собой метаболически затратный процесс для бактерий. Однако энергетические затраты на их производство компенсируются преимуществами, связанными с эффективной регуляцией группового поведения, обеспечивающего выживание и конкурентоспособность микроорганизмов в сложных биологических нишах, таких как полость рта.

В 1970 году Нельсон впервые описал механизм quorum sensing (QS) у *Vibrio fischeri* в контексте регуляции биолюминесценции, что стало отправной точкой для последующих исследований в области межбактериальной коммуникации. В дальнейшем было установлено, что система quorum sensing представляет собой универсальный механизм

взаимодействия между микроорганизмами, обеспечивающий их адаптацию к изменяющимся условиям окружающей среды за счёт координации коллективного поведения [21].

С помощью системы QS микроорганизмы регулируют широкий спектр физиологических процессов, включая формирование и созревание биоплёнок, агрегацию и коагрегацию клеток, адгезию к различным поверхностям, подвижность, а также синтез антимикробных агентов и факторов вирулентности. Эти процессы критически важны для выживания микробных сообществ и их конкурентоспособности в различных экологических нишах.

Особенностью системы quorum sensing является её универсальность и вариативность – механизмы QS обнаружены как у прокариотических организмов, так и у некоторых эукариот. При этом система может функционировать как внутри одного вида (интраспецифическая коммуникация), так и между различными видами микроорганизмов (интерспецифическая коммуникация), что особенно актуально в условиях полимикробных сообществ, таких как оральные биоплёнки.

Ключевая роль QS заключается в способности микроорганизмов действовать согласованно на популяционном уровне. Достижение критической численности бактериальной популяции инициирует каскад регуляторных реакций, направленных на оптимизацию жизнедеятельности сообщества. Таким образом, система quorum sensing служит эффективным инструментом коллективной адаптации, способствующим усилению патогенетического потенциала бактерий и их устойчивости к неблагоприятным факторам среды, включая антимикробную терапию [1].

Механизмы функционирования системы quorum sensing (QS) у грамположительных и грамотрицательных бактерий имеют принципиальные различия, что обусловлено использованием различных типов сигнальных молекул – аутоиндукторов (АИ). У грамотрицательных бактерий основными сигнальными соединениями являются N-ацил-L-гомосериновые лактоны

(AHL) или алкилхинолоны, как это наблюдается, например, у *Pseudomonas aeruginosa*. Эти молекулы обладают способностью свободно диффундировать через клеточную мембрану без энергетических затрат, что обеспечивает пассивную регуляцию процессов межклеточной коммуникации [30].

В отличие от них, грамположительные бактерии используют в качестве аутоиндукторов олигопептиды, которые требуют активного транспорта через клеточную стенку посредством специализированных транспортных систем. Эти пептидные сигналы синтезируются внутри клетки, после чего секретируются во внешнюю среду, где накапливаются по мере роста популяции и затем распознаются специфическими рецепторами, инициируя соответствующие клеточные ответы.

Несмотря на различия в природе сигнальных молекул и механизмах их доставки, у всех микроорганизмов система QS выполняет универсальную функцию – координацию активности генов в ответ на изменение плотности популяции и условий окружающей среды. Это позволяет бактериальным сообществам эффективно адаптироваться к внешним факторам, синхронизировать такие процессы, как формирование биоплёнок, выработка факторов вирулентности, устойчивость к стрессовым воздействиям и антимикробным агентам. Таким образом, quorum sensing представляет собой ключевой элемент регуляции коллективного поведения бактерий, обеспечивающий их выживание и патогенетический потенциал в сложных экосистемах, включая микробиоту полости рта [2].

Ярким примером функционирования системы quorum sensing (QS) является деятельность *Vibrio fischeri*, который посредством регуляторных белков, кодируемых генами luxI и luxR, синтезирует специфические сигнальные молекулы. Эти молекулы свободно распространяются между внутриклеточной и внеклеточной средой, достигая критической концентрации, после чего активируют экспрессию генов, ответственных за

биолюминесценцию. Данный механизм демонстрирует классическую модель QS у грамотрицательных бактерий.

Другим представителем грамотрицательных бактерий, активно использующим QS, является *Pseudomonas aeruginosa*. Этот микроорганизм посредством трёх взаимосвязанных сигнальных систем – Las, Rhl и Pqs – регулирует синтез множества патогенных факторов, включая протеазы LasA и LasB, а также экзотоксин A (ToxA). Кроме того, QS у *P. aeruginosa* играет ключевую роль в формировании и поддержании биоплёнок. Интересно, что данные регуляторные цепи могут как активировать, так и ингибировать друг друга, обеспечивая гибкую и адаптивную регуляцию вирулентности в зависимости от условий окружающей среды [12].

У грамположительных бактерий система QS также выполняет важные функции. В частности, *Staphylococcus aureus* использует пептидные сигнальные молекулы для контроля экспрессии широкого спектра факторов вирулентности, таких как гемолизины, лейкоцидины, липазы и нуклеазы. Данный процесс осуществляется под управлением генной системы agr, которая координирует переход бактерий к агрессивному фенотипу при достижении определённой плотности популяции [4].

Следует отметить, что многие микроорганизмы обладают несколькими системами QS, каждая из которых регулирует специфические группы генов. Однако в ряде случаев, особенно среди представителей родов *Bacillus, Streptococcus и Staphylococcus*, наблюдается значительное генетическое разнообразие как сигнальных молекул, так и их рецепторов, несмотря на то что конечная цель этих систем заключается в активации схожего набора генов. Этот феномен остаётся недостаточно изученным и представляет интерес для дальнейших исследований в области молекулярной микробиологии и межбактериальной коммуникации.

1.2. Микробиота полости рта и её роль в патогенезе

В настоящее время установлено, что микробиом полости рта обладает высокой степенью индивидуальности и относительной стабильности при физиологических условиях. Он представлен преимущественно микроорганизмами, относящимися к таким типам, как *Actinomycetota (*ранее *Actinobacteria), Bacteroidota, Bacillota (*ранее *Firmicutes), Fusobacteriota, Pseudomonadota (*ранее *Proteobacteria) и Spirochaetota*. Среди доминирующих родов бактерий наиболее часто встречаются представители *Streptococcus, Prevotella, Haemophilus, Rothia, Veillonella, Neisseria и Fusobacterium* [5].

Микробиом ротовой полости насчитывает более 600 видов микроорганизмов, при этом установлено, что различные анатомические структуры и ткани, такие как зубы, десневые борозды, язык, щёки, твёрдое и мягкое нёбо, а также миндалины, характеризуются специфическими микробными сообществами, отличающимися по составу и соотношению видов [11].

Следует отметить, что менее половины бактериальных видов, обитающих в полости рта, поддаются культивированию с использованием традиционных аэробных и анаэробных методов микробиологии. В связи с этим особую значимость приобретают культурально-независимые подходы, основанные на молекулярно-генетических технологиях, в частности на анализе последовательности гена 16S рРНК, позволяющие выявлять некультивируемые или трудно культивируемые микроорганизмы.

Так, в исследованиях F.E. Dewhirst и соавторов, проведённых с применением комбинированного подхода (культивирование и секвенирование 16S рРНК), было идентифицировано 1179 таксонов. Из них лишь 24% видов удалось полностью охарактеризовать, ещё 8% были успешно культивированы, но оставались без окончательной таксономической классификации, в то время как подавляющее большинство (68%) представляли собой некультивируемые филогенетические линии. Эти данные

подчёркивают сложность и разнообразие микробиоты полости рта, а также важность современных молекулярных методов для её изучения [40].

На формирование и состав орального микробиома оказывает влияние совокупность как эндогенных, так и экзогенных факторов. К эндогенным факторам относят наследственную предрасположенность и физиологические состояния, такие как беременность, способные изменять иммунологический статус организма и, соответственно, микробное равновесие в полости рта. Экзогенные факторы включают особенности питания, курение, употребление алкоголя, социально-экономические условия жизни, а также применение антимикробных препаратов, которые способны вызывать дисбаланс микробиоты за счёт подавления как патогенных, так и комменсальных микроорганизмов [10].

Современные молекулярно-генетические исследования, основанные на методах полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), позволили выявить многочисленные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в генах, отвечающих за регуляцию иммунного ответа. Ключевыми среди них являются гены интерлейкинов (IL10, IL6, IL4, IL8, IL17A), а также гены, кодирующие рецепторы к витамину D (VDR). Полиморфные варианты этих генов ассоциированы с повышенной склонностью к колонизации полости рта патогенными микроорганизмами [6].

В частности, установлено, что определённые аллельные варианты гена IL10 (например, A/G rs1800896 и C/T rs1800871) приводят к увеличению экспрессии данного цитокина в ответ на внешние раздражители. Нарушение регуляции иммунного ответа в таких условиях способствует развитию хронического воспаления, что, в свою очередь, провоцирует деструктивные изменения в тканях пародонта, включая разрушение альвеолярной кости. Эти процессы создают благоприятную среду для активного роста пародонтопатогенной микробиоты и приводят к существенным изменениям в составе орального микробиома, способствуя развитию и прогрессированию воспалительных заболеваний пародонта [21].

В нормальных физиологических условиях микробиота полости рта выполняет ряд важнейших функций, обеспечивающих как локальное, так и общее состояние здоровья человека. Одной из ключевых функций орального микробиома является защитная (барьерная) роль, которая реализуется посредством механизма конкурентного ингибирования. Комменсальные микроорганизмы, колонизирующие слизистую оболочку и твердые ткани полости рта, занимают доступные экосистемные ниши и рецепторные участки, тем самым препятствуя адгезии и последующему заселению патогенных или условно-патогенных бактерий. Кроме того, нормальная микрофлора продуцирует бактериоциноподобные вещества и органические кислоты, обладающие антимикробной активностью по отношению к потенциальным патогенам.

Важным аспектом функциональной активности микробиоты полости рта является её участие в поддержании местного иммунного гомеостаза. Комменсальные бактерии стимулируют базальный уровень иммунного ответа, способствуя формированию толерантности к собственным антигенам и обеспечивая сбалансированную активацию врожденных и адаптивных иммунных механизмов. Такой иммуномодулирующий эффект микробиоты предотвращает чрезмерную воспалительную реакцию на безвредные антигены, одновременно сохраняя готовность иммунной системы к адекватному ответу при внедрении патогенов [7].

Кроме того, микробиота полости рта активно вовлечена в процессы метаболической регуляции. Микроорганизмы синтезируют ряд биологически активных соединений, включая органические кислоты, полисахариды, витамины группы В, короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) и другие метаболиты, оказывающие положительное влияние на состояние слизистой оболочки и твёрдых тканей зубов. Например, продукция перекиси водорода (H_2O_2) некоторыми представителями рода *Streptococcus* способствует контролю роста патогенных бактерий, таких как *Streptococcus mutans*, ассоциированных с кариесогенной активностью [33].

Следует также отметить участие микробиоты в поддержании минерального баланса эмали зубов за счёт регуляции pH в полости рта. Нормальная флора способствует нейтрализации кислот, возникающих в результате ферментации углеводов, тем самым предотвращая деминерализацию твёрдых тканей зуба и развитие кариеса. В этом контексте особую роль играют бактерии рода *Veillonella*, утилизирующие молочную кислоту и способствующие стабилизации кислотно-щелочного равновесия.

Таким образом, микробиота полости рта представляет собой не просто совокупность микроорганизмов, но и активный компонент биологической системы человека, выполняющий важнейшие защитные, иммунорегуляторные и метаболические функции. Нарушение состава и баланса этого микробного сообщества (дисбиоз) приводит к утрате данных защитных механизмов и становится одним из ведущих факторов риска развития воспалительных и деструктивных заболеваний полости рта, включая кариес, гингивит и пародонтит.

В нормальных условиях микробиота полости рта существует в состоянии динамического равновесия, при котором комменсальные и условно-патогенные микроорганизмы находятся в контролируемом соотношении, обеспечивая гомеостаз локальной экосистемы. Однако под воздействием различных эндогенных и экзогенных факторов возможно развитие состояния, известного как оральный дисбиоз.

Дисбиоз представляет собой нарушение количественного и качественного состава микробиоты с доминированием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, сопровождающееся снижением численности и функциональной активности защитных представителей нормофлоры. Этот сдвиг микробного баланса приводит к утрате барьерной и иммуномодулирующей функции микробиоты, создавая условия для колонизации тканей агрессивными микробными сообществами [7].

Оральный дисбиоз признан ключевым этиопатогенетическим фактором при ряде заболеваний полости рта. В частности, установлено, что именно

нарушение микробного равновесия лежит в основе таких распространённых патологий, как:

1. Кариес зубов – в результате увеличения численности кариесогенных бактерий (*Streptococcus mutans, Lactobacillus* spp.), продуцирующих органические кислоты, способствующие деминерализации эмали.

2. Гингивит – воспаление десневого края, ассоциированное с ростом условно-патогенных анаэробных бактерий.

3. Пародонтит – хроническое воспалительное заболевание тканей пародонта, возникающее на фоне дисбаланса микробиоты с преобладанием таких патогенов, как Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola.

4. Оральный кандидоз – грибковое поражение слизистой оболочки полости рта, обусловленное избыточным ростом дрожжеподобных грибов рода Candida на фоне подавления нормальной бактериальной флоры.

Формирование дисбиотического состояния может быть связано с различными причинами, включая нерациональное применение антибиотиков, снижение иммунного статуса, эндокринные нарушения, стрессовые факторы, несоблюдение гигиены полости рта и вредные привычки (курение, избыточное потребление сахара и др.) [14].

Микробиота полости рта находится в постоянном взаимодействии с иммунной системой хозяина, обеспечивая поддержание гомеостаза и предотвращение чрезмерной воспалительной реакции на комменсальные микроорганизмы. Основную роль в этом процессе играют механизмы как врождённого, так и адаптивного иммунитета.

Во врождённом иммунном ответе ключевыми элементами являются толл-подобные рецепторы (TLR), расположенные на клетках эпителия, макрофагах и дендритных клетках слизистой оболочки полости рта. Эти рецепторы распознают консервативные молекулярные структуры микробных патогенов – так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), инициируя каскад защитных реакций. В условиях

нормального микробного баланса взаимодействие TLR с компонентами комменсальной микробиоты способствует поддержанию толерантности и регулирует продукцию противовоспалительных цитокинов [7].

Секреторный иммуноглобулин А (sIgA) играет ведущую роль в системе адаптивного иммунитета слизистых оболочек полости рта. Этот антителозависимый механизм обеспечивает нейтрализацию патогенных микроорганизмов и предотвращает их адгезию к эпителиальным поверхностям, не вызывая при этом воспалительной реакции на комменсальную микрофлору. sIgA формирует первый защитный барьер, ограничивая проникновение микроорганизмов в подлежащие ткани.

Дополнительными факторами иммунной защиты полости рта являются лизоцим, лактоферрин, дефензины и другие антимикробные пептиды, содержащиеся в слюне. Они обеспечивают неспецифическую защиту, регулируя численность микробных популяций и препятствуя избыточному росту патогенных видов.

Нарушение взаимодействия между микробиотой и иммунной системой приводит к развитию хронического воспаления и дисбиоза. Гиперактивация врождённого иммунного ответа или недостаточная продукция sIgA может способствовать разрушению тканевых барьеров и прогрессированию заболеваний, таких как гингивит и пародонтит [27].

Анализ современных данных о микробиоте полости рта свидетельствует о её высокой таксономической сложности и индивидуальности состава у каждого человека. В нормальных физиологических условиях оральная микробиота поддерживает динамическое равновесие между комменсальными и условно-патогенными микроорганизмами, играя важную роль в защите слизистой оболочки, регуляции иммунного ответа и предотвращении колонизации патогенами. Однако воздействие неблагоприятных эндогенных и экзогенных факторов приводит к развитию дисбиоза – смещению микробного баланса в сторону патогенных видов, что становится ключевым звеном в патогенезе таких

заболеваний, как кариес, гингивит, пародонтит и кандидоз полости рта. Нарушение взаимодействия между микробиотой и иммунной системой хозяина усугубляет воспалительные процессы, способствует разрушению тканей пародонта и хронизации патологических состояний. Особое значение в развитии воспалительных заболеваний имеет способность отдельных микроорганизмов к формированию устойчивых биоплёнок, защищающих микробное сообщество от действия антимикробных препаратов и факторов врождённого иммунитета. Взаимодействие бактерий через механизмы quorum sensing дополнительно усиливает патогенетический потенциал микробиоты при дисбиозе.

1.3. Устойчивость биоплёнок к антимикробным воздействиям

Внеклеточный полимерный матрикс (далее – ЭПМ) представляет собой ключевой структурный компонент биоплёнок, обеспечивающий их устойчивость и жизнеспособность в неблагоприятных условиях окружающей среды. ЭПМ формируется в процессе созревания биоплёнки и играет фундаментальную роль в защите микробного сообщества от действия антимикробных средств, иммунных факторов организма хозяина, а также физических воздействий [16].

ЭПМ является высокоорганизованной гелеобразной субстанцией, которая окружает бактериальные клетки и объединяет их в единую трёхмерную структуру. Основу матрикса составляют полимеры различной природы, главным образом экзополисахариды, белки, липиды и внеклеточная ДНК (вДНК). Соотношение этих компонентов варьирует в зависимости от вида микроорганизмов, условий среды и стадии развития биоплёнки.

Экзополисахариды являются доминирующим компонентом матрикса, обеспечивая его вязко-эластичные свойства и способствуя формированию прочной архитектуры биоплёнки. Белковые компоненты включают ферменты, структурные белки и адгезины, участвующие в стабилизации

межклеточных взаимодействий и регуляции физиологических процессов внутри микробного сообщества. Внеклеточная ДНК, выделяемая в результате автолиза части клеток или активного секреционного процесса, выполняет как структурную, так и регуляторную функцию, связывая полимерные цепи и укрепляя матрикс.

Компоненты ЭПМ создают физический и химический барьер, существенно ограничивающий доступ антимикробных агентов к клеткам, находящимся в глубинных слоях биоплёнки. Экзополисахариды обладают способностью к связыванию ионов и молекул, включая антибиотики и антисептики, что снижает их локальную концентрацию и активность. Белки матрикса могут включать ферменты, разрушающие антимикробные вещества, например β-лактамазы, нейтрализующие β-лактамные антибиотики [8].

Внеклеточная ДНК дополнительно усиливает барьерную функцию матрикса за счёт своей способности к катион-связыванию и образованию стабильных полимерных сетей, что препятствует проникновению гидрофильных и заряженных молекул. Кроме того, вДНК может служить источником генетического материала для горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам между клетками, тем самым способствуя повышению общей резистентности микробного сообщества.

Один из важнейших механизмов защиты биоплёнок связан с ограничением диффузии антимикробных агентов через плотную и гидрофобную структуру ЭПМ. Полимерная сеть матрикса задерживает крупные молекулы и ионы, создавая градиенты концентрации, в результате чего только незначительная часть активного вещества достигает живых клеток.

Дополнительно к физическому барьеру, в биоплёнке наблюдается эффект сорбции, при котором антимикробные препараты связываются с компонентами матрикса и теряют свою биологическую активность. В ряде случаев антимикробные агенты подвергаются химическим модификациям

под действием ферментов, локализованных в ЭПМ, что ещё более снижает их эффективность [19].

Таким образом, внеклеточный полимерный матрикс является не только механической защитой бактерий в биоплёнке, но и активным участником формирования устойчивости микробных сообществ к антимикробным воздействиям.

Одной из характерных особенностей биоплёночных микробных сообществ является высокая степень физиологической гетерогенности, проявляющаяся в различиях метаболической активности, устойчивости к внешним воздействиям и способности к адаптации среди клеток, находящихся в разных слоях биоплёнки. Это многообразие обусловлено градиентами кислорода, питательных веществ, pH и сигнальных молекул, создающих внутри биоплёнки сложную и динамичную микросреду.

Внутренняя структура биоплёнки характеризуется чётко выраженными зонами с различной степенью метаболической активности. Клетки, расположенные в наружных слоях биоплёнки, как правило, обладают высокой активностью, участвуют в росте, синтезе компонентов внеклеточного матрикса и активно взаимодействуют с внешней средой. В то же время клетки, находящиеся ближе к центру биоплёнки, испытывают дефицит кислорода и питательных веществ, что приводит к замедлению обменных процессов и переходу в состояние метаболического покоя [22].

Такая зональность обеспечивает не только устойчивость биоплёнки к изменяющимся условиям среды, но и формирует своеобразную «биологическую нишу» для выживания бактерий, находящихся в стрессовых условиях. Метаболически неактивные клетки становятся менее уязвимыми для антимикробных препаратов, действие которых чаще всего направлено на активно делящиеся микроорганизмы.

Особую роль в устойчивости биоплёнок играют так называемые персистентные клетки (persister cells) – субпопуляция бактерий, способных переходить в состояние глубокой метаболической инактивации. Эти клетки

не являются мутантами и сохраняют чувствительность к антибиотикам при выходе из состояния покоя, однако в момент воздействия лекарственного препарата остаются невосприимчивыми за счёт своей физиологической инертности.

Формирование персистентных клеток представляет собой адаптивную стратегию выживания, особенно эффективную в условиях циклических стрессов и многократного воздействия антимикробных агентов. После устранения неблагоприятных факторов персистентные клетки могут реинициировать рост, восстанавливая популяцию и, в случае патогенных бактерий, способствуя рецидивам инфекционного процесса [21].

Гетерогенность клеточного состояния внутри биоплёнки также обеспечивает устойчивость к различным стрессовым воздействиям, таким как изменение температуры, осмотического давления, pH и действие иммунных компонентов. Наличие клеток в различных физиологических состояниях увеличивает шансы на выживание популяции в целом, даже при возникновении экстремальных условий.

Кроме того, в биоплёнке часто происходит активная экспрессия стресс-ассоциированных генов, кодирующих белки шапероны, антиоксиданты и элементы систем репарации ДНК. Эти адаптационные механизмы усиливаются за счёт межбактериального обмена сигнальными молекулами, обеспечивающего координированный ответ на стресс и поддержание гомеостаза микробного сообщества.

Таким образом, физиологическая гетерогенность биоплёнки является одним из ключевых факторов её устойчивости, обеспечивая многоуровневую защиту как на уровне отдельной клетки, так и на уровне всего микробного сообщества.

Межбактериальная коммуникация, реализуемая посредством системы quorum sensing (QS), играет ключевую роль в регуляции устойчивости биоплёночных сообществ к антимикробным воздействиям. Этот механизм позволяет бактериям координировать своё поведение в зависимости от

плотности популяции, обеспечивая синхронную активацию генетических программ, направленных на выживание в неблагоприятных условиях [9].

Одним из важнейших аспектов функционирования QS является регуляция экспрессии генов, ответственных за устойчивость к антибиотикам, антисептикам и другим стрессовым факторам. По мере накопления сигнальных молекул (аутоиндукторов) в окружающей среде, бактерии запускают каскад транскрипционных изменений, способствующих усиленной продукции компонентов внеклеточного полимерного матрикса (ЭПМ), синтезу ферментов, разрушающих антибиотики (например, бета-лактамаз), и активации различных насосов эффлюкса, выталкивающих антимикробные вещества из клетки.

Кроме того, система quorum sensing регулирует экспрессию генов вирулентности, включая факторы адгезии, инвазии, токсинов и протеаз. Эти компоненты не только усиливают патогенетический потенциал биоплёнки, но и способствуют созданию дополнительного барьера для действия иммунной системы хозяина и антимикробной терапии [21].

QS обеспечивает формирование коллективных защитных стратегий, значительно повышающих устойчивость всего микробного сообщества. В рамках этих механизмов бактерии действуют как единая система, что позволяет им более эффективно реагировать на внешние угрозы. Среди таких коллективных реакций можно выделить:

1. Усиленный синтез ЭПМ в ответ на стрессовые сигналы, что приводит к утолщению и уплотнению защитного слоя биоплёнки.

2. Регуляция персистентности, когда под действием сигнальных молекул часть популяции переходит в состояние метаболического покоя, формируя резерв устойчивых клеток.

3. Координированная активация систем эффлюкса, способствующих снижению внутриклеточной концентрации токсичных веществ.

4. Выработка и секреция нейтрализующих ферментов, способных инактивировать антимикробные агенты до их проникновения в глубинные слои биоплёнки.

Особое значение имеет способность QS к интеграции сигналов как внутри одного вида бактерий, так и между различными видами в полимикробных сообществах, что характерно для оральных биоплёнок. Такая межвидовая коммуникация позволяет патогенным микроорганизмам использовать комменсальные виды в качестве защитного барьера, а также координировать синтез общих факторов устойчивости.

Таким образом, система quorum sensing выступает не только как механизм регуляции физиологических процессов, но и как один из ключевых факторов формирования устойчивости биоплёнок к антимикробным воздействиям [10].

Одним из ключевых факторов, обеспечивающих высокую устойчивость бактерий в составе биоплёнок к антимикробным воздействиям, являются генетические механизмы, направленные на сохранение и передачу признаков устойчивости. В биоплёночных сообществах данные механизмы реализуются с большей эффективностью по сравнению с планктонными (свободноживущими) формами бактерий, что обусловлено как особенностями структуры биоплёнки, так и активными процессами межбактериального взаимодействия.

В условиях плотного расположения клеток в биоплёнке значительно возрастает вероятность горизонтального переноса генетического материала между микроорганизмами. Этот процесс осуществляется посредством трансформации, трансдукции или конъюгации и приводит к быстрому распространению генов устойчивости к антибиотикам (ARGs – antibiotic resistance genes) в пределах микробного сообщества [33].

Особую роль в этом процессе играют плазмиды, транспозоны и интегроны, которые выступают мобильными элементами генома, способными переносить кластеры генов устойчивости сразу к нескольким

классам антимикробных препаратов. Биоплёнка, благодаря наличию внеклеточной ДНК (в составе ЭПМ), также создаёт благоприятную среду для трансформации – поглощения свободной ДНК бактериями с последующей интеграцией в их геном.

Одним из наиболее изученных механизмов защиты бактерий является синтез β-лактамаз – ферментов, способных гидролизовать β-лактамное кольцо антибиотиков (пенициллинов, цефалоспоринов и карбапенемов), тем самым инактивируя их. В биоплёнке экспрессия генов, кодирующих β-лактамазы, может быть индуцирована под воздействием субингибиторных концентраций антибиотиков, что приводит к локальному увеличению концентрации ферментов в окружающей среде [20].

Помимо β-лактамаз, бактерии в биоплёнках способны синтезировать другие защитные ферменты, такие как аминогликозид-модифицирующие ферменты, хлорамфеникол-ацетилтрансферазы и метилтрансферазы, обеспечивающие устойчивость к широкому спектру антимикробных средств. Коллективная секреция этих ферментов в пределах биоплёнки создаёт защитный барьер не только для продуцирующих бактерий, но и для других членов микробного сообщества.

Эффлюксные насосы (или транспортные системы выкачивания) являются важным элементом клеточной защиты, обеспечивающим активное удаление токсичных веществ, включая антибиотики, из цитоплазмы наружу. В биоплёночных бактериях наблюдается повышенная активность генов, кодирующих компоненты мультикомпонентных эффлюксных систем, таких как семейства RND (Resistance-Nodulation-Division), MFS (Major Facilitator Superfamily) и ABC (ATP-Binding Cassette). Эти насосы позволяют бактериям поддерживать сублетальные концентрации антибиотиков внутри клеток, предотвращая их ингибирующее или бактерицидное действие. В условиях биоплёнки эффлюксные системы действуют синхронно с другими механизмами устойчивости, формируя многоуровневую защиту [22].

Анализ современных данных показывает, что устойчивость микробных биоплёнок к антимикробным средствам является многофакторным и комплексным явлением, обеспечивающим выживаемость бактерий в неблагоприятных условиях. Ведущую роль в формировании защитного барьера играет внеклеточный полимерный матрикс (ЭПМ), который ограничивает диффузию антибиотиков и антисептиков, создавая физическую и химическую преграду для проникновения терапевтических агентов к клеткам. Дополнительным уровнем защиты выступает физиологическая гетерогенность клеток внутри биоплёнки, где чередование зон высокой метаболической активности и покоя, а также формирование персистентных клеток, способствует выживанию даже при воздействии высоких концентраций антимикробных препаратов. Эти клетки способны сохранять жизнеспособность и восстанавливать популяцию после завершения терапии. Важную роль в регуляции устойчивости играют механизмы межбактериальной коммуникации, реализуемые через систему quorum sensing, которая координирует коллективные защитные ответы микробного сообщества, включая активацию генов устойчивости и вирулентности. Генетические механизмы, такие как горизонтальный перенос генов, экспрессия ферментов, разрушающих антибиотики, и активность эффлюксных насосов, обеспечивают биоплёнкам не только защиту от текущих воздействий, но и адаптивные возможности к изменяющимся условиям среды и новым видам антимикробной терапии.

1.4. Методы исследования биоплёнок и их состава

Исследование биоплёночных сообществ, формирующихся в полости рта, представляет собой одно из ключевых направлений современной микробиологии и стоматологической науки. Биоплёнки, как особая форма организации микробных сообществ, обладают уникальными структурно-функциональными характеристиками, существенно отличающимися от

планктонных форм микроорганизмов. В полости рта биоплёнки играют двоякую роль: с одной стороны, они участвуют в поддержании микробного гомеостаза, с другой – становятся основным фактором патогенеза ряда заболеваний, включая кариес, гингивит и пародонтит [24].

Комплексный подход к изучению биоплёнок обусловлен их сложной природой, включающей многослойную пространственную структуру, разнообразие видов микроорганизмов, а также наличие внеклеточного полимерного матрикса (ЭПМ), выполняющего защитные и регуляторные функции. Для получения объективного представления о морфологии, составе и функциональной активности биоплёнок требуется использование широкого спектра методов – от классических микробиологических и биохимических до молекулярно-генетических и современных визуализационных технологий. Интеграция различных методологических подходов позволяет не только идентифицировать микроорганизмы, входящие в состав биоплёнки, но и исследовать их межбактериальные взаимодействия, метаболическую активность, а также механизмы устойчивости к антимикробным воздействиям.

Особого внимания заслуживают биоплёнки, формирующиеся на твёрдых зубных отложениях – налёте и зубном камне. В отличие от биоплёнок, развивающихся на мягких тканях полости рта, данные структуры характеризуются большей стабильностью и сложностью организации. Зубной камень представляет собой минерализованный субстрат, на поверхности и в микропорах которого формируются зрелые микробные сообщества, устойчивые к механическому удалению и антисептической обработке. Биоплёнки, ассоциированные с зубным камнем, обладают высокой плотностью и выраженной стратификацией, что затрудняет доступ антимикробных агентов к глубоколежащим слоям микробного сообщества [32].

Исследование биоплёнок, изолированных из зубных камней, требует применения специализированных методов подготовки образцов, включая

деликатное извлечение микробного материала без разрушения его архитектуры. Существенной методологической задачей является сохранение нативной структуры биоплёнки при последующем анализе, что критически важно для оценки пространственной организации, состава ЭПМ и распределения различных типов клеток.

Световая микроскопия традиционно применяется для первичной морфологической оценки биоплёнок, изолированных из зубных камней. Одним из ключевых этапов подготовки образцов является их окрашивание, что позволяет выявить структуру и плотность микробных колоний. Наиболее часто используется метод кристаллического фиолетового, обеспечивающий общее контрастирование биомассы, и позволяющий оценить степень разрастания биоплёнки. Дополнительно применяются красители, такие как сафранин, а также комбинированные методы окрашивания, направленные на дифференциацию клеточных и внеклеточных компонентов [6].

Световая микроскопия позволяет выявить особенности распределения клеток в биоплёнке, степень её гомогенности или, напротив, наличие зон с различной плотностью бактериальных масс. В случае биоплёнок, формирующихся на зубных камнях, фиксируются выраженные стратификационные слои, а также участки с повышенным содержанием экзополисахаридного матрикса, что указывает на зрелую стадию развития микробного сообщества.

Для детального изучения ультраструктуры биоплёнок применяются методы сканирующей (SEM) и трансмиссионной (TEM) электронных микроскопий. Эти технологии обеспечивают высокое разрешение, позволяющее визуализировать как отдельные бактериальные клетки, так и элементы внеклеточного полимерного матрикса (ЭПМ) [25].

Сканирующая электронная микроскопия (SEM) позволяет получить трёхмерные изображения поверхности биоплёнки, выявляя сложную топографию микробных колоний, наличие межклеточных мостиков и полисахаридных волокон, связывающих клетки между собой. Благодаря SEM

можно наблюдать процессы коагрегации различных видов микроорганизмов, а также взаимодействие бактерий с минеральной основой зубного камня.

Трансмиссионная электронная микроскопия (TEM), в свою очередь, используется для исследования внутренних структурных особенностей биоплёнки. Метод позволяет обнаружить тонкие детали, такие как организация клеточных оболочек, локализация ДНК в составе ЭПМ, а также участки с признаками клеточного лизиса или формирования персистентных форм бактерий.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (CLSM) представляет собой современный высокотехнологичный метод, обеспечивающий возможность трёхмерной реконструкции биоплёнок в их нативном состоянии. Одним из ключевых преимуществ CLSM является использование флуоресцентных красителей, позволяющих проводить дифференцированную оценку жизнеспособности клеток (например, посредством двойного окрашивания живых и мёртвых клеток) и анализировать распределение компонентов внеклеточного матрикса [33].

Метод CLSM особенно эффективен при изучении биоплёнок, формирующихся на сложных субстратах, таких как зубной камень, поскольку позволяет визуализировать внутреннюю архитектуру микробного сообщества без необходимости разрушения образца. Использование специфических флуоресцентных меток даёт возможность выделить экзополисахариды, внеклеточную ДНК, белковые компоненты, а также определить пространственное соотношение различных видов бактерий внутри биоплёнки.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из наиболее широко используемых методов молекулярной диагностики для определения видового состава микробиоты биоплёнок. Применение специфических праймеров позволяет выявлять как отдельные патогенные виды, так и группы микроорганизмов, ассоциированных с развитием воспалительных заболеваний пародонта.

Метод ПЦР отличается высокой чувствительностью и специфичностью, что делает его незаменимым инструментом для быстрой и точной детекции пародонтопатогенных бактерий, включая *Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Treponema denticola* и другие. Кроме того, ПЦР активно используется для мониторинга эффективности антимикробной терапии путём количественной оценки бактериальной нагрузки.

Одним из ключевых молекулярно-генетических методов, позволяющих существенно углубить представление о составе микробных сообществ биоплёнок, является секвенирование гена 16S рРНК. Данный подход основан на анализе консервативных и гипервариабельных участков рибосомальной РНК, присутствующих у всех прокариот. Это делает метод универсальным инструментом для идентификации широкого спектра бактериальных таксонов, включая те, которые не поддаются культивированию в лабораторных условиях или требуют особых условий роста. Секвенирование 16S рРНК позволяет проводить таксономическую классификацию микробов вплоть до уровня рода или вида, что особенно актуально при изучении сложных микробных сообществ, формирующихся в зубном камне и других структурах полости рта. В условиях, когда традиционные микробиологические методы обеспечивают ограниченное представление о реальном составе биоплёнки, 16S-секвенирование становится важнейшим аналитическим инструментом, обеспечивающим высокую чувствительность и достоверность.

Кроме того, данный метод позволяет выявлять редкие и условно-патогенные виды, которые могут играть ключевую роль в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. Он также может использоваться для мониторинга изменений микробиоты под влиянием лечения, оценки дисбиотических нарушений и разработки индивидуализированных терапевтических стратегий. Таким образом, секвенирование гена 16S рРНК является неотъемлемой частью современных микробиологических

исследований биоплёнок и служит основой для метагеномического анализа микробиоты зубного камня [34].

Секвенирование 16S рРНК даёт возможность не только выявить присутствие известных патогенов, но и обнаружить ранее неописанные филогенетические линии, что существенно дополняет картину микробного разнообразия биоплёнок зубных камней. Данный подход является основой для создания микробных карт и баз данных, отражающих специфику микробиоты полости рта как в норме, так и при патологических состояниях.

Метагеномика представляет собой наиболее современный и комплексный метод исследования микробных сообществ, позволяющий анализировать полное генетическое содержание биоплёнки без необходимости предварительного культивирования микроорганизмов. В отличие от секвенирования отдельных генов (например, 16S рРНК), метагеномный анализ охватывает всё разнообразие генетического материала, включая гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам, синтез факторов вирулентности и механизмы межбактериальной коммуникации.

Применение метагеномического подхода к изучению микробных биоплёнок, формирующихся в зубных отложениях, открывает новые возможности для комплексного анализа структуры и функции микробных сообществ. В отличие от традиционных методов культивирования, метагеномика позволяет выявить как культивируемые, так и труднокультивируемые или некультивируемые микроорганизмы, обеспечивая высокую разрешающую способность при изучении видового состава и генетического разнообразия микробиоты.

Кроме таксономического профилирования, метагеномика даёт представление о функциональном потенциале биоплёнки, включая наличие генов, связанных с адгезией, продукцией матрикса, устойчивостью к антибиотикам, метаболизмом и межбактериальными взаимодействиями. Это позволяет не только реконструировать микробные сообщества, но и

оценивать их патогенетическую значимость, а также механизмы персистенции и воспаления, лежащие в основе заболеваний пародонта.

Метагеномные данные особенно актуальны для выявления маркеров дисбиоза, характерных для перехода от симбиотических к патогенным сообществам, и могут использоваться для прогнозирования клинического течения воспалительных заболеваний, оценки риска рецидивов и стратификации пациентов. Кроме того, на их основе разрабатываются персонализированные подходы к профилактике и терапии, в том числе с использованием пробиотических и постбиотических стратегий воздействия на микробиоценоз полости рта [24].

Одним из базовых и наиболее широко применяемых методов определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам является тест на минимальную ингибирующую концентрацию (МИК). Суть метода заключается в установлении наименьшей концентрации антимикробного агента, при которой полностью подавляется видимый рост микроорганизмов в жидкой или твёрдой среде. Метод МИК является стандартом в клинической микробиологии и служит основой для подбора рациональной антибактериальной терапии при острых инфекциях.

Однако при всей своей диагностической ценности традиционный подход к определению МИК ориентирован преимущественно на планктонные (свободноплавающие) формы бактерий, тогда как большинство патогенов в хронических инфекциях, включая заболевания полости рта, существуют в виде биоплёночных сообществ. В биоплёнке бактерии окружены внеклеточным матриксом, находятся в состоянии метаболической инактивации или покоя, а также обладают плотными межклеточными контактами, что существенно ограничивает проникновение и действие антибиотиков.

Как следствие, значения МИК, полученные в стандартных условиях, не отражают реальную устойчивость бактерий в составе биоплёнки, и могут в десятки или даже сотни раз недооценивать необходимую терапевтическую

концентрацию. В этой связи возникает необходимость в разработке и использовании специализированных методов оценки антимикробной активности в отношении биоплёночных форм, таких как MBEC (minimum biofilm eradication concentration), модифицированные тесты in vitro и биочип-платформы, моделирующие биоплёнки в условиях, приближенных к in vivo.

Для адаптации метода к биоплёнкам используются модификации, включающие предварительное формирование биоплёнки на различных субстратах (например, на поверхности микропланшетов), после чего проводят воздействие антимикробными агентами и оценивают остаточную жизнеспособность бактерий. Такой подход позволяет более точно оценить реальные параметры устойчивости микробных сообществ в составе биоплёнок.

Специфические тест-системы, направленные на оценку устойчивости биоплёнок, включают широкий спектр in vitro моделей, разработанных для воспроизведения различных аспектов биоплёночного роста и оценки реакции микробных сообществ на антимикробное воздействие. Среди них наиболее распространённой и стандартизированной методикой является количественное окрашивание биоплёнок кристаллическим фиолетовым, которое позволяет определить общее количество биомассы, сохранившейся после обработки исследуемыми препаратами.

Суть метода заключается в том, что кристаллический фиолетовый связывается с компонентами внеклеточного полимерного матрикса и клеточными стенками бактерий, позволяя визуализировать и количественно оценить степень сохранности биоплёнки. После фиксации и промывания окрашенный материал растворяется (чаще всего в этаноле или ацетоне), и измеряется оптическая плотность (OD) при длине волны 570-600 нм, чаще всего при 590 нм (OD_{590}). Сравнение OD между контрольными и обработанными образцами позволяет судить об эффективности антимикробных агентов. Эта методика обладает рядом преимуществ: простота, воспроизводимость, высокая чувствительность к массовым

изменениям в структуре биоплёнки. Однако она не отражает жизнеспособность клеток внутри матрикса, поэтому целесообразно дополнять её метаболическими тестами или микроскопическими методами, особенно при оценке резистентности биоплёнок к антибиотикам и антисептикам [27].

Другим распространённым и информативным методом оценки биоплёнок является использование метаболических тестов, основанных на определении жизнеспособности клеток внутри биоплёночной структуры. Одним из наиболее надёжных и чувствительных подходов является резазурин-тест, в основе которого лежит способность активных дыхательных ферментов живых клеток восстанавливать резазурин в флуоресцентный резорфиновый продукт. Изменение окраски или флуоресценции отражает уровень метаболической активности бактерий, находящихся в биоплёнке.

В отличие от методов, основанных исключительно на измерении массы биоплёнки (например, окраска кристаллическим фиолетовым), метаболические тесты позволяют оценить функциональное состояние микробного сообщества, выявляя живые и метаболически активные клетки даже при сохранении общей структуры биоплёнки. Это особенно важно при тестировании эффективности антибиотиков, антисептиков или других антимикробных агентов, когда структурная целостность может сохраняться, несмотря на гибель части бактериальной популяции.

Таким образом, включение метаболических тестов в исследование устойчивости биоплёнок позволяет получить более полное представление о живучести и потенциальной резистентности бактерий, находящихся в матриксе, и служит важным дополнением к классическим морфологическим и фотометрическим методам анализа.

Современным и перспективным направлением в исследовании устойчивости биоплёнок является применение биочипов и микрофлюидных систем, которые открывают новые возможности для моделирования сложных биологических процессов in vitro. Эти технологии позволяют воспроизводить

микросреду, максимально приближенную к физиологическим условиям полости рта, включая такие ключевые параметры, как динамика течения жидкости (слюны), концентрация питательных веществ, уровень кислорода и pH среды.

Использование микрофлюидных платформ даёт возможность точно контролировать и варьировать внешние условия, наблюдать в реальном времени за адгезией бактерий, ростом и созреванием биоплёнок, а также оценивать их устойчивость к антимикробным агентам. Такие системы особенно актуальны при изучении поведения полимикробных сообществ, типичных для ротовой полости, а также при тестировании эффективности комбинированных терапевтических подходов (например, антибиотики + ингибиторы матрикса).

Таким образом, микрофлюидные технологии становятся ценным инструментом в трансляционной микробиологии, позволяя не только глубже понять механизмы формирования и устойчивости биоплёнок, но и разрабатывать персонализированные стратегии лечения, адаптированные под реальные клинические условия.

Современные микрофлюидные платформы представляют собой инновационные инструменты, позволяющие моделировать условия микросреды, в которых формируются и функционируют биоплёнки. Эти технологии обеспечивают непрерывное наблюдение за процессами адгезии, роста, созревания и разрушения биоплёночных структур в реальном времени, что существенно расширяет возможности фундаментальных и прикладных микробиологических исследований. Одним из ключевых преимуществ микрофлюидных систем является высокая чувствительность и воспроизводимость при минимальном расходе реагентов и исследуемого материала, что делает их особенно ценными при работе с труднорастущими или клинически значимыми штаммами.

Кроме того, биочипы на основе микрофлюидных технологий позволяют параллельно тестировать множественные параметры в рамках

одного эксперимента. Это включает одновременную оценку устойчивости различных штаммов к антимикробным препаратам, динамику их взаимодействия в полимикробных сообществах, а также реакцию на комбинированное лечение (например, антибактериальные препараты в сочетании с ингибиторами матрикса или средствами, нарушающими межклеточную коммуникацию). Такие платформы обладают высоким потенциалом в разработке персонализированных терапевтических подходов, особенно при лечении хронических инфекций, ассоциированных с биоплёнками, включая стоматологические и пародонтологические заболевания.

Изучение биоплёнок, формирующихся на зубных отложениях, требует применения комплексного методологического подхода, сочетающего классические микроскопические, микробиологические и современные молекулярно-генетические технологии. Каждый из используемых методов обладает своими преимуществами и ограничениями, что обуславливает необходимость их комбинированного использования для получения наиболее полной и объективной картины. Микроскопические методы, включая световую, электронную и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию, позволяют детально визуализировать архитектуру биоплёнок, оценить морфологические особенности микроорганизмов, их пространственную организацию и взаимодействие с внеклеточным полимерным матриксом. Эти подходы незаменимы при изучении структуры и стадий формирования биоплёнок на поверхности зубного налёта и камня. Молекулярно-генетические методы, в частности ПЦР, секвенирование гена 16S рРНК и метагеномный анализ, обеспечивают высокоточную идентификацию микроорганизмов, включая некультивируемые виды, и позволяют оценить функциональный потенциал микробных сообществ. Эти технологии открывают новые возможности для диагностики микробного дисбаланса и определения маркеров патогенности. Методы оценки устойчивости биоплёнок к антимикробным препаратам играют ключевую

роль в разработке эффективных терапевтических стратегий. Применение как традиционных микробиологических тестов, так и инновационных микрофлюидных систем позволяет моделировать реальные условия полости рта и проводить тестирование различных антисептических и антибактериальных средств.

Таким образом, интеграция различных методологических подходов обеспечивает комплексное исследование биоплёнок, изолированных из зубных камней.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Объектом настоящего исследования являются микроорганизмы, выделенные из твёрдых зубных отложений – зубного камня – пациентов с признаками воспалительных заболеваний пародонта. Зубной камень представляет собой минерально-органическое образование, формирующееся на поверхности зубов в результате длительного существования зубного налёта и его кальцификации. Он является естественной моделью зрелой микробной биоплёнки in vivo и представляет значительный интерес в аспекте изучения механизмов устойчивости бактерий к внешним воздействиям, в том числе антимикробным препаратам.

Материал для микробиологических исследований был получен от пациентов, проходивших амбулаторное стоматологическое лечение. Отбор материала осуществлялся с соблюдением всех требований асептики: зубной камень извлекался стерильными кюретами из поддесневой или наддесневой области и сразу же помещался в стерильные пробирки, содержащие изотонический раствор или транспортную среду. До момента обработки пробы хранились при температуре +4 °C и доставлялись в микробиологическую лабораторию в течение 2 часов.

Из каждого образца зубного камня методом серийного разведения и посева на твёрдые питательные среды общего назначения (например, мясо-пептонный агар, кровяной агар) были выделены чистые культуры микроорганизмов. Первичная идентификация видов проводилась по морфологическим, культуральным и тинкториальным свойствам с использованием световой микроскопии, а также учётом скорости роста, формы колоний и их окраски, также использовалась MALDI-TOF масс-спектрометрия для точного подтверждения видовой принадлежности изолятов. По результатам микроскопии и окрашивания по Граму и MALDI-

TOF большинство видов относились к грамположительным и грамотрицательным коккам и палочкам, характерным для микробиоценоза ротовой полости.

Данные изоляты стали основой для оценки их биоплёнообразующей способности в модельных условиях in vitro. Это позволило не только количественно оценить их способность к прикреплению и росту на инертной поверхности, но и провести сравнение между различными видами по уровню образования биоплёнки. Кроме того, полученные виды использовались в экспериментах по оценке межвидовых взаимодействий, устойчивости к антибиотикам в составе биоплёнок и молекулярной идентификации доминирующих видов.

Таким образом, объектами исследования являются клинические изоляты бактерий, полученные из зубных камней, обладающие различной степенью способности к формированию биоплёнок и представляющие интерес для дальнейшего изучения их фенотипических характеристик, устойчивости и взаимодействий в составе микробных сообществ.

В данной работе по итогам исследований клинических изолятов бактерий выделенных из зубных камней стали 15 видов бактерий: *Streptococcus oralis*, *Streptococcus anginosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus gasseri*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus salvariu*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus paracasei*.

2.2. Методы выделения, культивирования и оценки биоплёнообразования бактерий, изолированных из зубных камней

Микробные биоплёнки, образующиеся в полости рта, особенно на поверхности зубных отложений, представляют собой сложные, организованные сообщества бактерий, обладающих высокой устойчивостью

к действию антисептиков и антибиотиков. В связи с этим изучение способности клинических изолятов к формированию биоплёнок in vitro имеет важное прикладное значение, позволяя выявить наиболее активные в этом процессе виды и оценить их потенциальную роль в патогенезе заболеваний пародонта.

В качестве инокулята для получения биопленок используют ночную культуру бактерий, выращенную до стационарной фазы. Оптическая плотность (OD_{600}) культуры, вносимой в лунку, называется стартовой. Во многом скорость образования биопленки зависит именно от этого параметра.

Культуру разводят свежей стерильной средой до оптической плотности OD_{600} = 0,01-0,05 оптических единиц. Иногда для медленнорастущих культур используют более высокую стартовую плотность, вплоть до OD_{600} = 0,1-0,2. Для экспресс-тестов, культура может быть дополнительно разведена 1:100, чтобы нивелировать значение стартовой плотности и плотности инокулята. Популярным является разведение 1:20, так как оно в среднем регулирует скорость роста культуры. При использовании многоканальных пипеток или видов, стартовую оптическую плотность культуры нормируют, т.е. доводят до одного значения. Инокуляцию и разведение удобнее всего проводить при циркуляции стерильного воздуха в ламинаре.

Для достоверного обсчёта результатов следует использовать не менее 4-5 лунок на один опытный образец. Дополнительно засевают четыре лунки чистой средой как негативным контролем. Ёмкость со средой или планшет плотно накрывают крышкой и помещают в термостат в горизонтальном положении на ровную поверхность.

Метод O'Toole and Kolter, 1998 основан на способности красителя кристаллического фиолетового (CV) связываться с клетками и матриксом биопленок. Для элюирования красителя используют различные органические растворители (таблица 2.1.).

Метод позволяет получить относительные показатели плотности всей биопленки на поверхности подложки, но не всегда отражает интенсивность формирования биопленки на разделе среда – воздух.

Ход работы:

Для получения биоплёнок в лабораторных условиях чаще всего используют 96- или 24-луночные планшеты, реже – чашки Петри, в зависимости от целей исследования и предполагаемой площади адгезии. Такая модель позволяет стандартизировать условия роста и прикрепления бактерий, обеспечивая воспроизводимость результатов при параллельном анализе большого количества образцов.

После завершения фазы инкубации, необходимой для формирования биоплёнки, из лунок планшета аккуратно удаляют жидкую питательную среду, содержащую планктонные клетки. Следующим шагом проводится промывка лунок с целью удаления оставшихся неадгезированных клеток и компонентов среды. Промывка осуществляется в течение 2-3 минут с использованием стерильного фосфатного буфера (PBS, pH 6.0-7.0), объём которого соответствует исходному объёму среды. Буфер после промывки удаляется полностью, чтобы исключить разбавление красителя на последующем этапе окрашивания.

Затем в каждую лунку вносят 0,1% водный фильтрованный раствор генциан фиолетового (альтернативное название – кристаллический фиолетовый), объёмом 1-4 мл для 24-луночных планшетов или 200 мкл для 96-луночных, обеспечивая полное покрытие всей внутренней поверхности. Планшеты оставляют на 10-15 минут при комнатной температуре для инкубации с красителем, в течение которой происходит его связывание с клеточной массой и компонентами внеклеточного матрикса биоплёнки.

По завершении окрашивания несвязавшийся краситель удаляют из лунок, после чего проводят промывку тёплой водопроводной водой или PBS-буфером. Возможны различные способы промывания: многократное пипетирование, промывание под струёй воды или статическое замачивание.

Однако в рамках одного эксперимента необходимо придерживаться единого метода, чтобы исключить вариативность и обеспечить сопоставимость полученных результатов.

После промывки планшеты переворачивают на фильтровальную бумагу и оставляют при комнатной температуре до полного высыхания. На этом этапе окрашенные лунки можно анализировать визуально, выполнять фотофиксацию, а также использовать их в последующих этапах – для элюирования связанного красителя и измерения оптической плотности раствора. В сухом виде окрашенные планшеты могут храниться в течение до двух недель, не теряя исследовательской ценности.

Для этапа элюирования связанного кристаллического фиолетового в каждую лунку вносят 95% раствор этанола либо смесь этанол:изопропанол в соотношении 1:1, в объёме 200 мкл для 96-луночных планшетов или 1-4 мл – для планшетов с большим объёмом лунок либо чашек Петри. Выбор объёма зависит от площади поверхности, на которой сформировалась биоплёнка, с тем чтобы обеспечить полное покрытие зоны окрашивания.

Органические растворители способствуют десорбции красителя, связанного как с клетками, так и с внеклеточным матриксом биоплёнки. В качестве альтернативных элюентов могут применяться диметилсульфоксид (DMSO), ацетон, уксусная кислота и их смеси, при этом выбор конкретного растворителя определяется видовой принадлежностью микроорганизмов, плотностью биоплёнки и чувствительностью компонентов системы. В ряде случаев использование определённого растворителя способствует более эффективному высвобождению красителя, что важно для получения корректных фотометрических данных (таблицу 2.1).

Таблица 2.1.

Оптимальные условия для проведения тестирования некоторых микроорганизмов

Организм	Температура инкубации (°C)	Раствор для солюбилизации	Источник
Agrobacterium tumefaciens	28	100% DMSO (диметилсульфоксид)	Danhorn et al., 2004
Escherichia coli	25	80% этанол / 20% ацетон	O'Toole et al., 1999
Pseudomonas aeruginosa	25-37	95% этанол	O'Toole et al., 1999
Pseudomonas fluorescens	25-50	95% этанол	O'Toole et al., 1999
Staphylococcus aureus	37	33% ледяная уксусная кислота	Stepanovic et al., 2001
Streptococcus mutans	37	95% этанол или 100% DMSO	O'Toole et al., 1999
Vibrio cholerae	25-30	100% DMSO	O'Toole et al., 1999

После завершения этапа элюирования связанного красителя, образовавшийся раствор аккуратно отбирается и переносится в чистые плоскодонные планшеты, подходящие для спектрофотометрического анализа. Измерение оптической плотности (OD) окрашенного раствора проводится при длине волны в диапазоне 500-600 нм, в зависимости от используемого спектрофотометра и особенностей красителя. Наиболее часто в литературе и практике применяется длина волны 590 нм, которая считается оптимальной для оценки степени связывания кристаллического фиолетового с биоплёнкой и обеспечивает высокую чувствительность метода при стандартной концентрации красителя.

Результаты интерпретируются на основании измеренной оптической плотности, согласно данным таблицы 2.2.

Таблица 2.2.

Оценка эффективности биопленкообразования по окрашиванию генциан фиолетовым

Оптическая плотность (OD)	Продукция биоплёнки
$ODc \leq x < 2 \times ODc$	Нет / слабая
$2 \times ODc \leq x < 4 \times ODc$	Умеренная
$x \geq 4 \times ODc$	Плотная
Где ODc – значение оптической плотности негативного контроля; Tsd – стандартное отклонение контроля, умноженное на три.	

Метод оценки интенсивности пленкообразования с использованием кристаллического фиолетового позволяет количественно оценить общую плотность биоплёнки, сформированной на поверхности подложки. Он эффективен для первичного скрининга и сравнительного анализа между видами. Однако данный метод не предоставляет информации о численности жизнеспособных клеток, составляющих биоплёночную массу, поскольку окрашиванию подвержены как живые, так и погибшие клетки, а также компоненты внеклеточного матрикса (полисахариды, белки, ДНК). В связи с этим, для получения более точного представления о жизнеспособности и активности микробного сообщества в составе биоплёнки, необходимо проведение дополнительного бактериального анализа.

Для оценки доли клеточного компонента и определения количества живых бактерий, прочно удерживающихся в структуре биоплёнки, проводят разрушение матрикса и высвобождение клеток. После удаления жидкой среды и промывки биоплёнки от планктонных клеток, лунки обрабатывают фосфатным буфером (PBS), после чего применяется ультразвуковая дисперсия. При этом важно учитывать, что ультразвук способен нарушать целостность биоплёнки и способствовать выходу до 40% клеток за первые 6-8 секунд обработки. Время и мощность ультразвуковой обработки подбираются индивидуально, с целью минимизации повреждения клеток при

максимальной эффективности разрушения полисахаридного каркаса биоплёнки.

Образовавшийся супернатант, содержащий высвобождённые клетки, собирается и используется для количественного анализа жизнеспособности. Для этого проводят посевы на плотные питательные среды, чаще всего на мясо-пептонный или кровяной агар, с последующей инкубацией в течение 24-48 часов при оптимальной температуре (обычно 35-37 °C). По окончании инкубации производится подсчёт числа колониеобразующих единиц (КОЕ) с учётом предварительных разведений, что позволяет рассчитать концентрацию жизнеспособных бактерий в исходной биоплёнке.

Для повышения достоверности результатов рекомендуется использовать повторные высевы (дубли или трипликаты), а также контрольную культуру с заранее известной концентрацией клеток. Это позволяет скорректировать расчёты и подтвердить эффективность метода. Дополнительно целесообразно проводить параллельное высевание супернатанта после ультразвуковой обработки и остатков на подложке, чтобы убедиться в полном разрушении биоплёнки и учесть возможные ошибки, связанные с неполным высвобождением клеток.

Таким образом, сочетание фотометрического метода оценки общей биомассы и бактериологического метода подсчёта КОЕ позволяет получить более полное представление о структуре и активности биоплёночного сообщества.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Морфологическая и колониальная характеристика выделенных видов

В результате микробиологического анализа материала, полученного из зубных камней, было выделено 15 морфологически и культурально различных бактериальных изолятов. Их первичная характеристика включала описание микроскопической морфологии, подвижности, роста на плотных и жидких питательных средах.

Микроскопическое исследование окрашенных мазков (по Граму) выявило, что большинство изолятов представляют собой грамположительные кокки, располагавшиеся одиночно, парами (в виде диплококков) либо короткими цепочками. У отдельных видов, например, *Streptococcus mutans*, наблюдалась шаровидная, характерная для кокков морфология. Формирует капсулу из гиалуроновой кислоты. Подвижность не была подтверждена ни у одной из пятнадцати изолятов. Однако важно учитывать, что нежизнеспособность бактерий не является абсолютным признаком — некоторые микроорганизмы в составе зубного камня могут быть временно неактивными, но при определённых условиях способны к восстановлению жизнедеятельности.

Колониальные характеристики оценивали после инкубации на мясо-пептонном агаре (МПА) и кровяном агаре. Большинство изолятов образовывали гладкие, выпуклые, круглые колонии диаметром от 1 до 3 мм, белого, сероватого или кремового цвета. У ряда видов (например, *Staphylococcus hominis* и *Streptococcus anginosus*) отмечалась влажная, слизистая консистенция, что может свидетельствовать о присутствии внеклеточного матрикса – возможного маркера биоплёнообразования.

Рисунок 1. *Streptococcus mitis, Staphylococcus epidermidis*

При культивировании в жидкой среде (мясо-пептонный бульон, МПБ) почти все изоляты демонстрировали равномерное помутнение среды, у некоторых наблюдалось пристеночное кольцо, что указывает на поверхностное прикрепление и активный рост. Эти признаки были особенно выражены у видов *Streptococcus mutans, Streptococcus anginosus и Staphylococcus hominis.*

Обобщённые данные по морфологическим и культуральным признакам представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1.

Морфологические и колониальные характеристики бактериальных изолятов, выделенных из зубного камня

Вид	Микроморфология	Подвижность	Колонии (агар)	Рост в МПБ
Micrococcus luteus	Гр+ кокки, цепочки	Нет	Гладкие, круглые, 2 мм	Помутнение
Lactobacillus casei	Гр+ палочковидная	Нет	Гладкие, выпуклые, непрозрачные	Помутнение
Lactobacillus paracasei	Гр+ палочковидная	Нет	Кремовые, белые, выпуклые 3 мм	Помутнение
Streptococcus mutans	Гр+ кокки	Нет	Мелкие сероватые, 1.5 мм	Помутнение + кольцо
Staphylococcus aureus	Гр+ кокки	Нет	Круглые, гладкие, с блестящей поверхностью	Помутнение
Streptococcus	Гр+ кокки	Нет	Кремовые	Помутнение

oralis				
Streptococcus mitis	Гр+ кокки	Нет	Бледно-желтые, выпуклые	Помутнение
Streptococcus anginosus	Гр+ кокки	Нет	Слизистые, влажные	Помутнение
Lactobacillus fermentum	Гр+ кокки	Нет	Гладкие, белые	Помутнение
Staphylococcus epidermidis	Гр+ кокки	Нет	Белые, выпуклые	Помутнение
Streptococcus constellatus	Гр+ кокки	Нет	Гладкие	Помутнение
Staphylococcus hominis	Гр+ кокки	Нет	Круглые, диаметром 1–2 мм, приподнятым центром, белые	Помутнение + осадок
Streptococcus salvarius	Гр+ кокки	Нет	Белые	Помутнение
Lactobacillus gasseri	Гр+ кокки	Нет	Гладкие	Помутнение
Streptococcus haemolyticus	Гр+ кокки	Нет	Плоские, мелкие, сероватые	Помутнение

Таким образом, проведённый морфологический и культуральный анализ позволил установить, что большинство изолятов, выделенных из зубного камня, представляют собой грамположительные кокки, не обладающие подвижностью и не формирующие спор. Несмотря на общие черты, отдельные виды демонстрировали характерные особенности, такие как палочковидная форма (*Lactobacillus casei*), подвижности обнаружено не было, слизистые колонии (*Streptococcus anginosus, Staphylococcus hominis*), что может быть связано с повышенной способностью к формированию биоплёнки.

Данные морфологического и культурального профиля легли в основу дальнейшего изучения биологических свойств этих изолятов, включая их способность к формированию устойчивых микробных сообществ в виде биоплёнок.

3.2. Способность изолятов к образованию биоплёнок на субстратах

Формирование биоплёнок является одним из ключевых факторов патогенности и устойчивости микроорганизмов в полости рта. С целью количественной оценки способности бактериальных изолятов, выделенных из зубного камня, к биоплёнообразованию, проводилось культивирование на полистирольных 96-луночных планшетах с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым и фотометрическим измерением оптической плотности при длине волны 590 нм (OD_{590}).

Каждый изолят инкубировался в течение 24 часов, после чего биоплёнки фиксировались, промывались и окрашивались. Интенсивность окрашивания, измеренная фотометрически, отражала массу сформированной биоплёнки. Оценка проводилась в 5 повторностях для каждого вида, что позволило получить достоверные количественные характеристики.

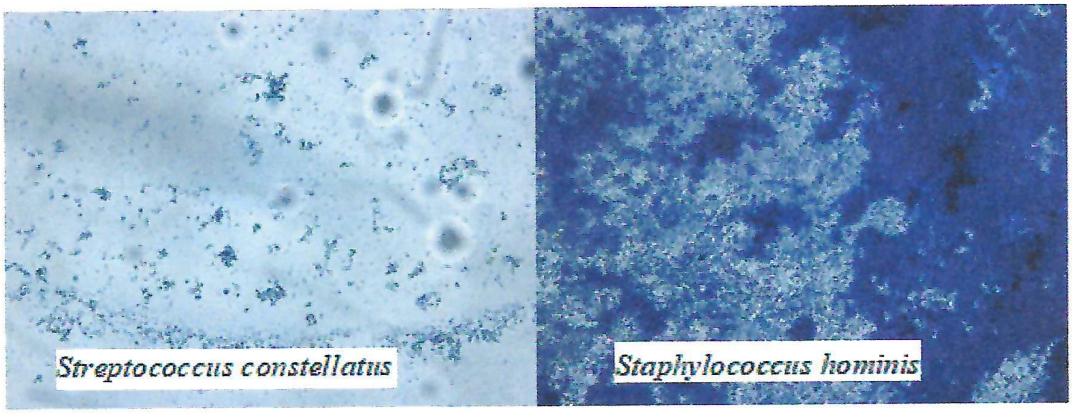


Рисунок 2. Изображения, полученные при микроскопировании видов *Streptococcus constellatus, Staphylococcus hominis*

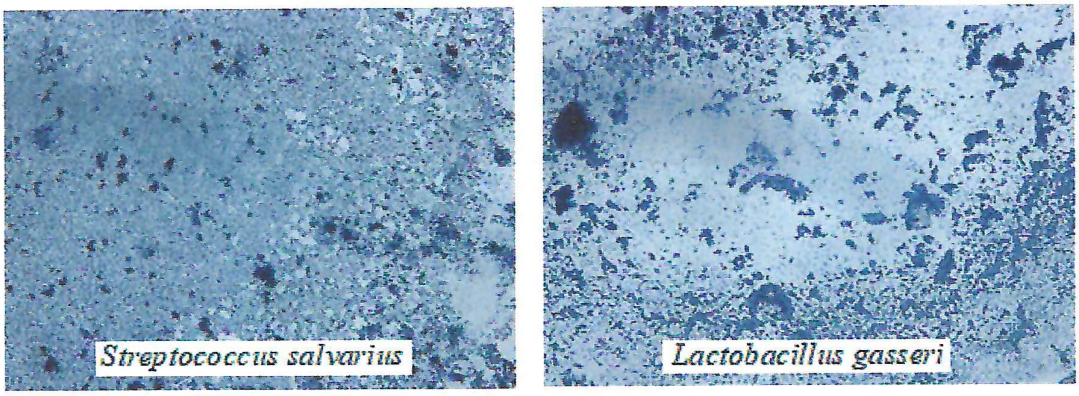


Рисунок 3. Изображения, полученные при микроскопировании видов *Streptococcus salvarius, Lactobacillus gasseri*

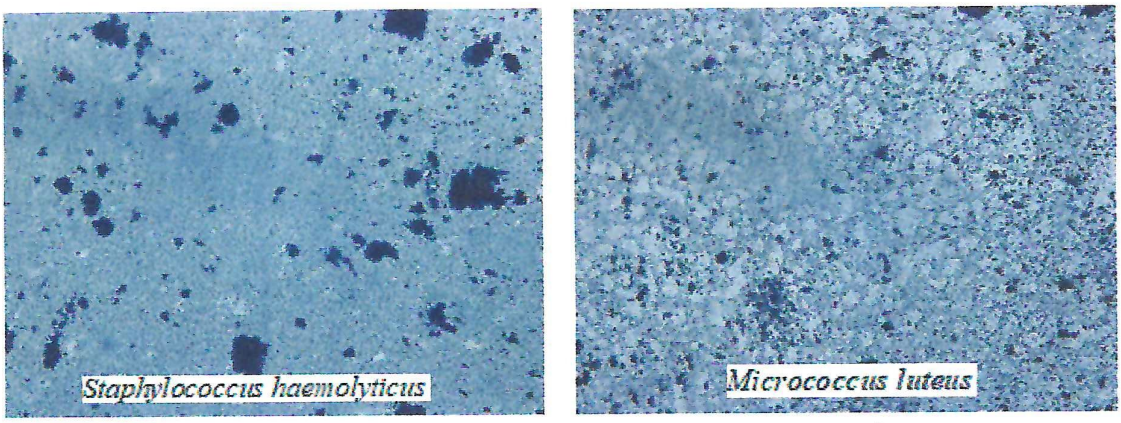


Рисунок 4. Изображения, полученные при микроскопировании видов *Micrococcus luteus, Staphylococcus haemolyticus*

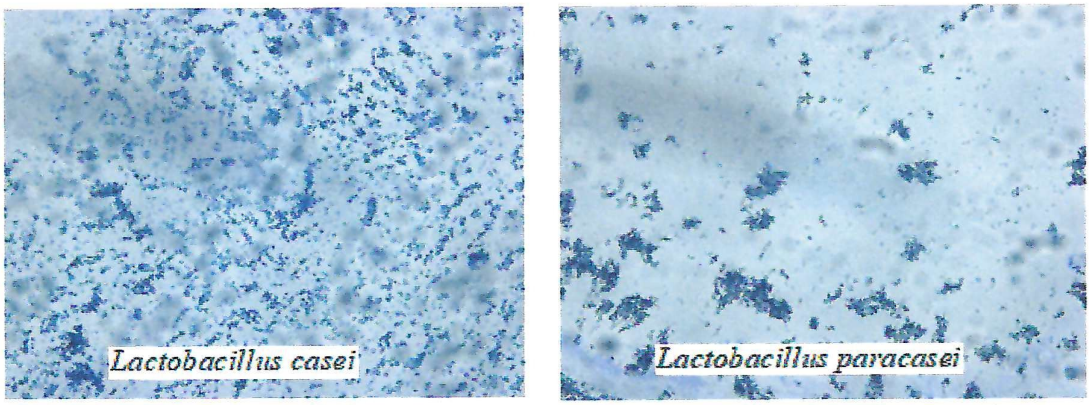


Рисунок 5. Изображения, полученные при микроскопировании видов *Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei*

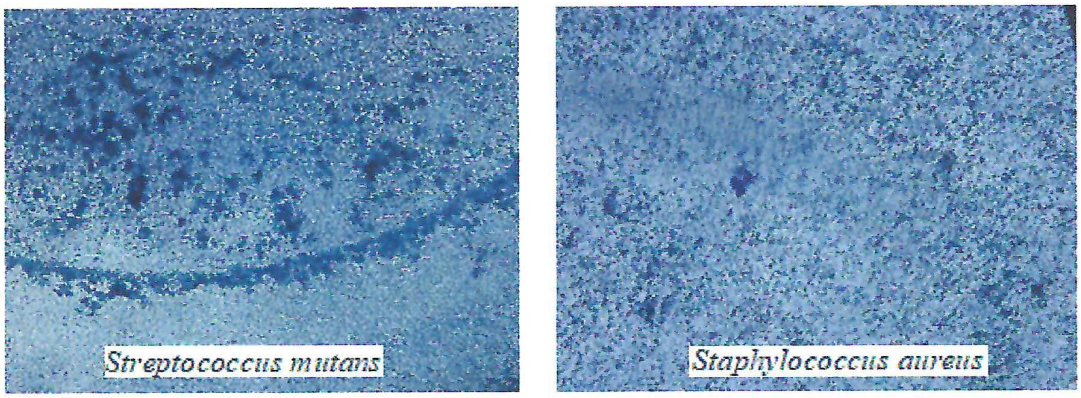


Рисунок 6. Изображения, полученные при микроскопировании видов *Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus*

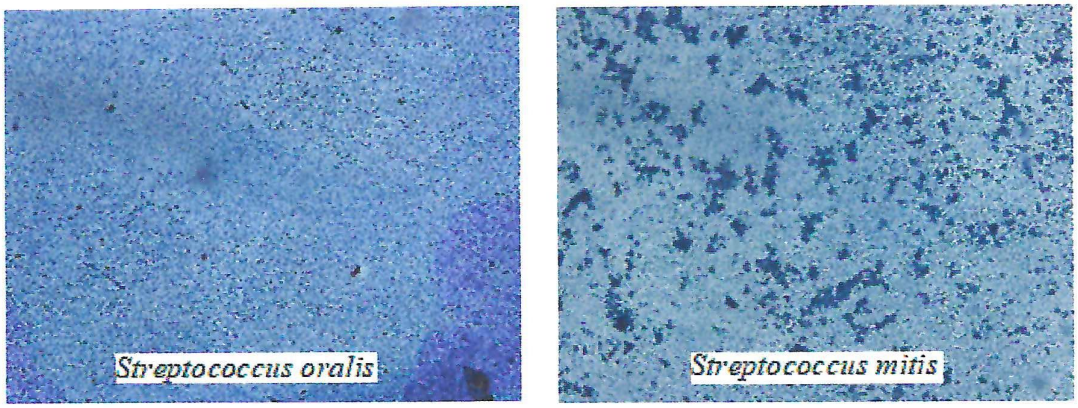


Рисунок 7. Изображения, полученные при микроскопировании видов *Streptococcus oralis, Streptococcus mitis*

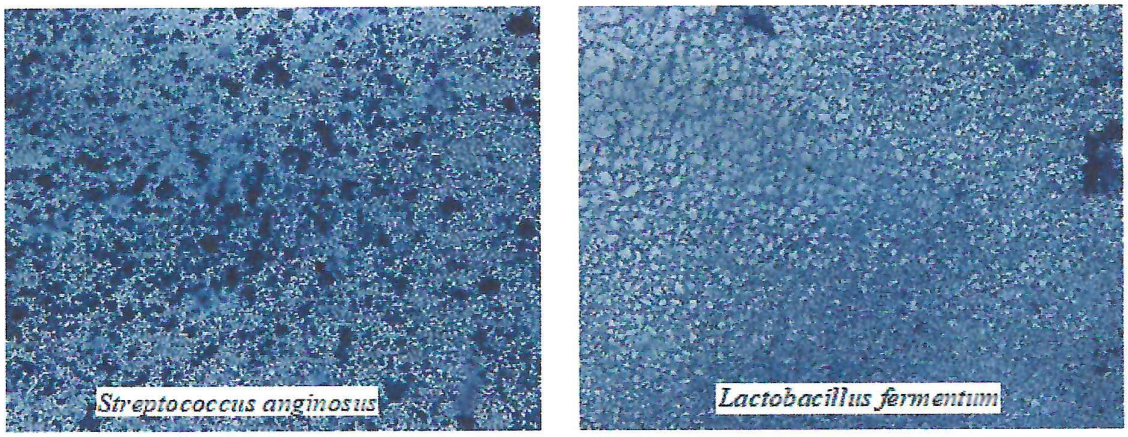


Рисунок 8. Изображения, полученные при микроскопировании видов *Streptococcus anginosus, Lactobacillus fermentum*

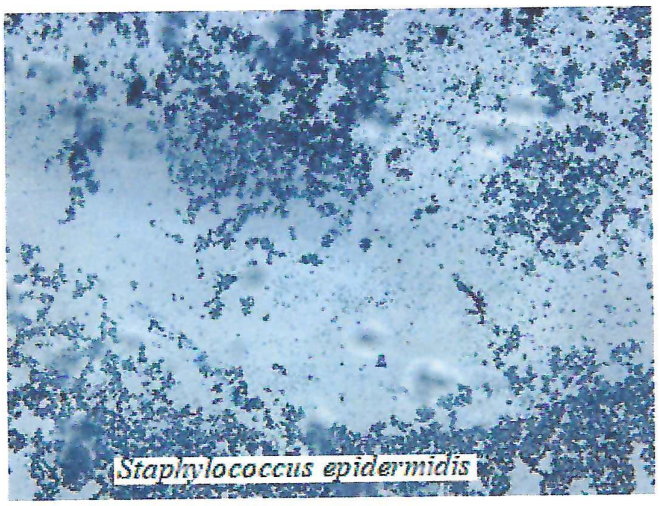


Рисунок 9. Изображения, полученные при микроскопировании видов *Staphylococcus epidermidis*

Полученные значения были классифицированы по шкале Stepanovic и представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2.

Интенсивность биоплёнообразования (OD_{590}) для изолятов, выращенных в 96-луночном планшете

Well	Mean_OD590	SD	Дов.инт. Ст.откл. -95,000%	Дов.инт. Ст.откл. +95,000%
1	1,1690	0,0031	0,0018	0,0088
2	0,0867	0,0001	0,0001	0,0004
3	0,0891	0,0002	0,0001	0,0005
4	0,4627	0,0007	0,0004	0,0019
5	0,1909	0,0003	0,0002	0,0008
6	0,1609	0,0001	0,0001	0,0003
7	0,5914	0,0055	0,0033	0,0158
8	0,2825	0,0016	0,0009	0,0045
10	0,0644	0,0001	0,0001	0,0002
11	0,1199	0,0005	0,0003	0,0014
12	0,3674	0,0015	0,0009	0,0044
13	0,0725	0,0001	0,0001	0,0004
14	0,0623	0,0001	0,0001	0,0003
15	0,0592	0,0002	0,0001	0,0005

Результаты количественной оценки способности изолятов к образованию биоплёнок показали значительную вариабельность между видами. Значения оптической плотности OD_{590} варьировали от 0,0592 до 1,1690, что отражает различную интенсивность формирования биоплёночной массы.

Наиболее выраженное биоплёнообразование было зарегистрировано у образца в лунке 1 (*Micrococcus luteus)* (OD_{590} = 1,1690), что может свидетельствовать о высокой продуктивности внеклеточного матрикса и способности к прочной адгезии. Также к числу видов с высокой биоплёночной активностью можно отнести лунки 7(*Staphylococcus hominis)* (0,5914), 12(*Streptococcus mutans)* (0,3674) и 4 (*Staphylococcus epidermidis*)(0,4627).

Минимальные значения OD_{590} наблюдались в лунках 15 (*Lactobacillus paracasei)* и 14 (*Lactobacillus casei)* (соответственно, 0,0592и 0,0623), что указывает на слабое или умеренное биоплёнообразование. Полученные данные демонстрируют наличие как высоко-, так и низкопроизводительных видов по способности к биоплёнообразованию и подтверждают необходимость их дальнейшей идентификации и функционального анализа.

Для подтверждения воспроизводимости и стабильности биоплёнообразующих свойств выделенных изолятов была проведена вторая серия экспериментов по индукции биоплёнок в 96-луночных микропланшетах. Методика оставалась неизменной: после инкубации культур и окрашивания кристаллическим фиолетовым, плотность сформированных биоплёнок определялась фотометрически при 590 нм.

Результаты повторной оценки представлены в таблице 3.3. Полученные значения оптической плотности (OD_{590}) по ряду F демонстрируют высокую степень воспроизводимости, а также позволяют подтвердить стабильность биоплёнообразования у ряда видов.

Таблица 3.3.

Способность изолятов к биоплёнообразованию: вторая серия измерений OD_{590} (ряд F, микропланшет)

Well	Mean_OD590	SD
1	1,04304	0,012219
2	0,81168	0,006963
3	1,29044	0,013759
4	0,68844	0,036022
5	0,7714	0,09768

Анализ данных второй серии экспериментов подтвердил высокую способность большинства исследованных изолятов к формированию биоплёнок. Значения OD_{590} варьировали от 0,688 до 1,290, что соответствует умеренному и плотному уровню биоплёнообразования по шкале Stepanovic.

Наибольшую активность вновь продемонстрировал изолят в лунке 3 (*Micrococcus luteus)* (OD_{590} = 1,2904), что совпадает с результатами первой серии и указывает на стабильный и воспроизводимый фенотип. Высокие значения также наблюдались в лунках 1(*Streptococcus oralis)* (1,0430) и 2 (*Streptococcus mutans)* (0,8117), что свидетельствует о выраженном формировании биоплёнки.

Несмотря на умеренно повышенные стандартные отклонения, особенно в лунке 5(*Staphylococcus hominis)* (SD = 0,0977), разброс данных не повлиял на общую интерпретацию: все изоляты данной выборки показали способность к формированию устойчивых биоплёнок в лабораторных условиях. Это подтверждает биологическую значимость выбранных видов как моделей для последующего изучения устойчивости и межвидовых взаимодействий в составе микробных сообществ.

3.4. Идентификация доминирующих видов в структуре биоплёнок

Одной из важнейших задач настоящего исследования стало определение уровня биоплёнообразующей активности бактериальных видов, выделенных из зубного камня, с целью выявления наиболее агрессивных и устойчивых форм, способных к длительной персистенции в ротовой полости. Для этого была проведена индивидуальная инкубация каждого изолята в условиях in vitro в 96-луночных полистирольных микропланшетах, имитирующих твердые субстраты, на которых микроорганизмы могут формировать биоплёнки.

После 24-часового культивирования осуществлялись этапы фиксации, окрашивания кристаллическим фиолетовым и растворения окрашенного биоматериала в этаноле, что позволило перейти к количественной оценке биомассы биоплёнки. Измерения оптической плотности проводились на фотометре при длине волны 590 нм (OD_{590}), что является стандартом в методике оценки биоплёнообразования.

Каждый вид высевался в двух биологических повторностях, что обеспечивало надёжность полученных данных. Расчёт среднего значения OD_{590} позволил объективно сравнить изоляты между собой. Далее проводилась классификация по шкале Stepanovic, которая делит микроорганизмы на четыре категории в зависимости от интенсивности биоплёнкообразования:

– нет/слабая;

– умеренная;

– плотная;

– (в некоторых интерпретациях – очень плотная).

Таким образом, на основании полученных результатов была осуществлена количественная и качественная оценка способности каждого изолята к формированию биоплёнок, что позволило выделить наиболее значимые виды с потенциальной клинической значимостью.

Результаты измерений и соответствующие уровни биоплёнообразования представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5.

Средние значения OD_{590} и уровень биоплёнообразования у 15 видов (микропланшетный метод, λ=590 нм)

Вид	Повтор A	Mean_OD590	Стандартное отклонение (σ)	Класс биоплёнки (Stepanovic)
Streptococcus oralis	0,2716	0,2274	0.0441	Умеренная
Streptococcus mutans	1,6267	1,2556	0.0711	Плотная
Streptococcus anginosus	0,4804	0,5012	0.0208	Плотная
Staphylococcus epidermidis	0,8131	0,6827	0.0304	Плотная
Streptococcus mitis	0,2974	0,3128	0.0154	Плотная
Lactobacillus gasseri	0,1954	0,3947	0.0992	Плотная
Micrococcus luteus	0,3537	0,3663	0.0182	Плотная
Streptococcus haemolyticus	0,5017	0,3453	0.0522	Плотная
Streptococcus salvarius	0,3251	0,4696	0.0444	Плотная
Lactobacillus fermentum	0,1302	0,1555	0.0253	Умеренная
Lactobacillus casei	0,2397	0,2357	0.0227	Умеренная
Lactobacillus paracasei	0,0863	0,0814	0.0129	Нет/слабая
Staphylococcus aureus	0,3485	0,4023	0.0131	Плотная
Streptococcus constellatus	0,2474	0,2203	0.0523	Умеренная
Staphylococcus hominis	0,5371	0,7059	0.0421	Плотная

Проведённый анализ индивидуальных значений оптической плотности (OD_{590}), полученных в результате микропланшетного тестирования, позволил количественно оценить уровень биоплёнообразования для каждого из 15 исследованных бактериальных изолятов. Этот подход обеспечил объективное сравнение биоплёночной активности между видами и дал

возможность классифицировать их по степени выраженности формирования биоплёнки.

Согласно принятой в современной микробиологической практике классификации Stepanovic, которая основывается на пороговых значениях OD_{590}, 11 из 15 видов (что составляет 73%) были отнесены к категории «плотное биоплёнообразование». Это свидетельствует о высокой адгезивной способности и интенсивной продукции внеклеточного матрикса, необходимых для формирования зрелых и устойчивых биоплёночных структур. Наиболее активными по этому параметру оказались изоляты *Streptococcus mutans* (OD_{590} = 1,2556), *Staphylococcus hominis* (OD_{590} = 0,7059) и *Staphylococcus epidermidis* (OD_{590} = 0,6827), демонстрируя устойчивую и воспроизводимую способность к биоплёнкообразованию.

Умеренный уровень биоплёнообразования зафиксирован у видов *Streptococcus oralis, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus casei и Streptococcus constellatus*, с диапазоном OD_{590} от 0,155 до 0,235, что также может иметь клиническое значение. Даже при относительно низкой адгезивной активности такие изоляты способны формировать биоплёнки в составе сложных полимикробных сообществ, особенно при наличии синергических межвидовых взаимодействий.

Примечательно, что лишь один вид (*Lactobacillus paracasei*) не проявил способности к формированию биоплёнки при проведении эксперимента, что делает его исключением среди всего набора исследованных культур. Это может быть обусловлено как биологическими особенностями самого микроорганизма, так и условиями культивирования.

В целом, полученные данные однозначно указывают на то, что большинство исследованных бактериальных изолятов из зубного камня обладают способностью к устойчивому и активному биоплёнообразованию, что подтверждает их потенциальную роль в поддержании хронического воспаления, снижении эффективности антибактериальной терапии и рецидивировании заболеваний пародонта. Данные виды, с высокой долей

вероятности, можно рассматривать как доминирующие виды микробиоты, формирующие основу структурной организации биоплёнок зубного камня.

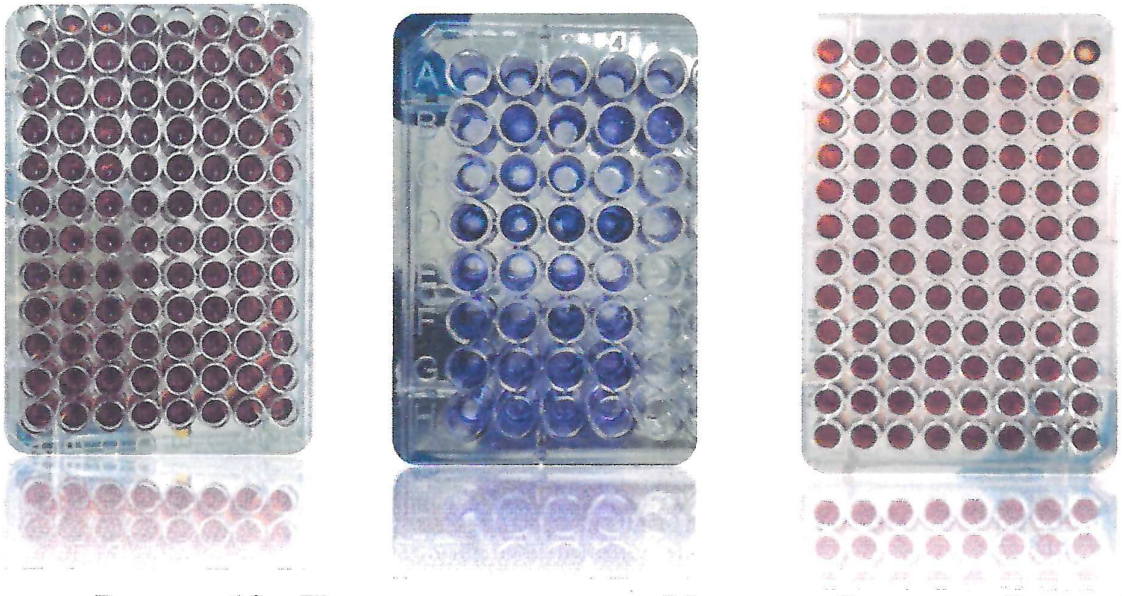


Рисунок 10 – Посев и окрашивание в 96 луночный планшет бактерий выделенных из зубных камней

На правом изображении, визуальная проверка культур после нароста 7 суток, чётко видно равномерное помутнение среды по всей площади лунок, отсюда следует, рост бактерий.

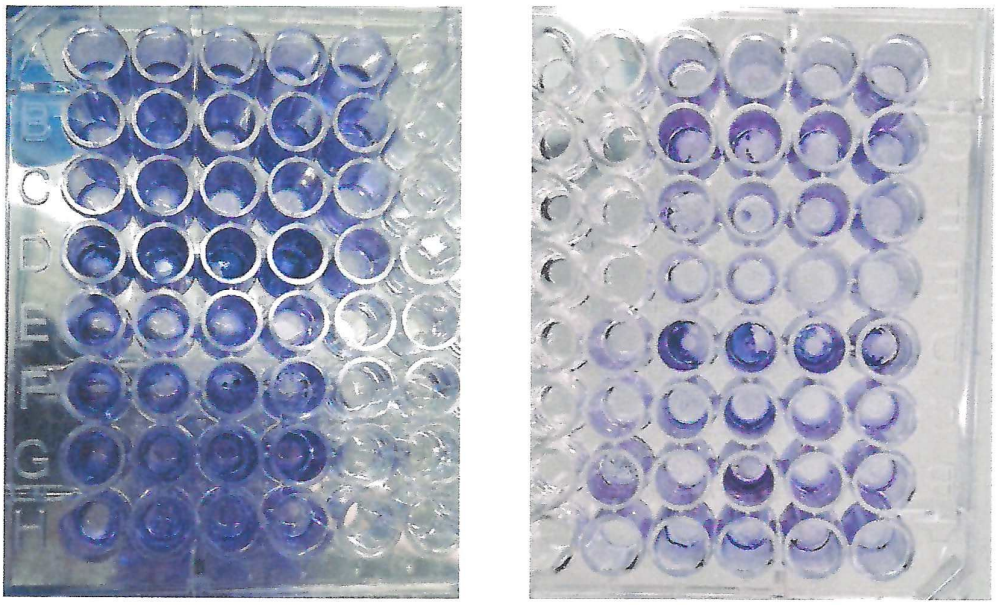


Рисунок 11. Окрашенные и высушенные биопленки бактерий выделенные из зубных камней.

На представленных изображениях визуально различима степень интенсивности окрашивания лунок микропланшета, отражающая вариативность биоплёнообразования между отдельными бактериальными изолятами. Лунки с насыщенным фиолетовым окрашиванием соответствуют видам с выраженной адгезивной активностью и массивным образованием внеклеточного матрикса, в то время как более светлые или почти бесцветные лунки указывают на слабое или отсутствующее биоплёнообразование.

Данный этап является завершающим в стандартной процедуре количественной оценки биомассы биоплёнки методом OD_{590} и служит визуальным подтверждением достоверности и воспроизводимости полученных данных.

3.5. Сравнительный анализ биоплёночной активности разных изолятов

Для получения объективного и обобщённого представления о биоплёнообразующей активности исследованных бактериальных изолятов была проведена сравнительная оценка способности шести видов (обозначенных буквами A-F) к формированию биоплёнок на инертной поверхности полистирольных лунок микропланшета. Эти изоляты были предварительно отобраны на основании различий в морфологических и культуральных признаках, а также предположительной принадлежности к разным видам, что обеспечивало разнообразие характеристик внутри выборки.

Каждая бактериальная культура инкубировалась в течение 24 часов при стандартных лабораторных условиях. По завершении инкубации несвязанные клетки удалялись промыванием, а адгезированные биоплёнки подвергались фиксации и окрашивались кристаллическим фиолетовым, классическим красителем, специфически связывающим компоненты внеклеточного матрикса. Далее биомасса биоплёнок растворялась в 96%

этаноле, и полученный раствор использовался для фотометрического измерения оптической плотности на длине волны 590 нм (OD_{590}).

Каждый изолят был протестирован в трёх и более повторностях, что обеспечивало статистическую достоверность результатов. Средние значения OD_{590} были рассчитаны и сопоставлены с критериями классификации Stepanovic, согласно которой биоплёночная активность условно подразделяется на отсутствующую или слабую, умеренную и плотную. Эта система позволяет корректно интерпретировать степень биоплёнообразования и использовать её как ориентир при отборе видов для дальнейшего молекулярного и функционального анализа.

Полученные данные были сведены в сравнительную таблицу, отражающую уровень биоплёнкообразования каждого изолята и его категорию по принятой классификации.

Результаты представлены в таблице 3.6., отражающей различия в биоплёночной активности между изолятами A-F.

Таблица 3.6.

Сравнительный уровень биоплёнообразования изолятов A-F на основе OD_{590} и классификации по шкале Stepanovic

	Вид	Mean_OD	Biofilm_Formation
A	*Micrococcus luteus*	0,475909	Плотная
B	*Streptococcus anginosus*	0,423564	Плотная
C	*Streptococcus mitis*	0,3485	Плотная
D	*Streptococcus salvarius*	0,22035	Умеренная
E	*Streptococcus mutans*	0,7059	Плотная
F	*Staphylococcus epidermidis*	0,464269	Плотная

Проведённый сравнительный анализ биоплёночной активности бактериальных изолятов, обозначенных как A-F, показал, что пять из шести видов (83%) демонстрировали высокий уровень биоплёнообразования, соответствующий категории «плотная» по классификации Stepanovic. Данные подтверждаются значениями оптической плотности (OD_{590}),

превышающими пороговое значение в 0,3, что свидетельствует о выраженной способности к адгезии и образованию стабильных биоплёночных структур.

Наиболее активным оказался изолят E, для которого было зафиксировано максимальное среднее значение OD_{590} – 0,7059, что может свидетельствовать о его потенциальной роли в доминировании микробного сообщества и формировании устойчивых биоплёнок, способных противостоять антибактериальной терапии.

Изолят D оказался единственным представителем, отнесённым к категории «умеренное биоплёнообразование» (OD_{590} = 0,22035). Несмотря на более низкое значение оптической плотности, он также продемонстрировал наличие базовой способности к прикреплению и формированию биоплёнки, что может приобретать клиническое значение при участии в полимикробных взаимодействиях.

Таким образом, результаты данной серии экспериментов подтверждают, что большинство исследованных видов обладают выраженной биоплёночной активностью, что подчёркивает их возможное участие в патогенезе хронических воспалительных процессов полости рта. Эти изоляты могут рассматриваться как кандидаты на дальнейшее молекулярно-генетическое и видоспецифическое исследование, направленное на выявление механизмов устойчивости и патогенности в условиях биоплёночного роста.

В результате проведённых исследований установлено, что большинство бактериальных изолятов, выделенных из зубного камня, обладают выраженной способностью к формированию биоплёнок. Морфологический и культуральный анализ показал преобладание грамположительных кокков, характеризующихся типичными признаками биоплёнообразующих микроорганизмов – наличие слизистых колоний, пристеночного роста в жидкой среде и высокая адгезивность.

По результатам количественной оценки (OD_{590}), более 70% изолятов демонстрировали плотное биоплёнообразование. Повторные измерения подтвердили стабильность и воспроизводимость этих показателей. Оценка межвидовых взаимодействий выявила как синергические эффекты (усиление биоплёнки при совместном культивировании), так и антагонистические, что подчёркивает сложность микробных сообществ, формирующих зубной камень.

Экспериментальная проверка устойчивости биоплёнок к антибиотикам показала частичную эффективность ампициллина и хлорамфеникола, с уровнем подавления OD_{590} от 20 до 45%. При этом некоторые виды (например, *Streptococcus mutans и Streptococcus anginosus*) сохраняли высокие значения OD после воздействия, что свидетельствует об их биоплёночной резистентности.

Сравнительный анализ биоплёночной активности различных изолятов продемонстрировал, что большинство исследованных видов (включая A, B, C, E и F) обладают выраженной способностью к формированию зрелых и устойчивых биоплёнок. Их средние значения оптической плотности OD_{590} соответствуют классификации «плотное биоплёнообразование» по шкале Stepanovic, что подтверждает высокий уровень прикрепления и продукции внеклеточного матрикса. Данные результаты подчёркивают, что биоплёночная форма роста является не случайной, а доминирующей стратегией существования микроорганизмов в условиях ротовой полости, особенно в хронически воспалённых зонах, таких как зубной налёт и камень. Подобная организация микробного сообщества обеспечивает защиту от внешних факторов, включая иммунные механизмы и антимикробные препараты, значительно повышая устойчивость патогенов к терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоплёнки представляют собой сложные, высокоорганизованные микробные сообщества, обладающие структурной устойчивостью, физиологической активностью и способностью к длительной персистенции в организме хозяина. Их формирование включает три ключевых этапа: адгезию, созревание с образованием внеклеточного полимерного матрикса и дисперсию.

Исследования последних десятилетий, начиная с работ Listgarten, значительно расширили представления о микробиологической и морфологической структуре оральных биоплёнок при физиологических и патологических состояниях (гингивит, пародонтит, пародонтоз). При хронических воспалительных заболеваниях пародонта наблюдаются выраженные изменения в составе и архитектуре биоплёнок: возрастает доля грамотрицательных, анаэробных и подвижных форм, нарушается микробное равновесие и усиливаются признаки патогенности. В процессе созревания биоплёнки ключевую роль играют коагрегирующие микроорганизмы, такие как *Fusobacterium nucleatum*, а также поздние колонизаторы – анаэробные патогены (*Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola*), способные вызывать воспаление и разрушение тканей пародонта. Особую роль в патогенезе локализованных и генерализованных форм пародонтита играет *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, обладающий высокой способностью к формированию устойчивых биоплёнок, защищённых внеклеточным матриксом и ферментативно регулируемыми механизмами прикрепления и дисперсии. Система quorum sensing (QS) играет центральную роль в межклеточной коммуникации внутри биоплёнок, регулируя экспрессию генов вирулентности, устойчивости и выживания. QS-механизмы различаются у грамположительных и грамотрицательных бактерий и позволяют координировать поведение популяции в зависимости от плотности клеток. Накапливающиеся данные о структуре, микробном

составе и механизмах регуляции оральных биоплёнок подчёркивают их важную роль в патогенезе воспалительных заболеваний полости рта и необходимость разработки антибиоплёночных терапевтических стратегий.

В ходе проведённого исследования была установлена высокая биоплёнообразующая активность большинства бактериальных изолятов, выделенных из зубного камня. Морфологические, культуральные и микроскопические характеристики видов подтвердили их принадлежность преимущественно к грамположительным коккам, обладающим способностью к адгезии и формированию зрелых биоплёнок.

Эксперименты с использованием микропланшетного метода показали, что более 70% изолятов способны к плотному биоплёнообразованию, а количественная оценка OD_{590} позволила выделить наиболее активные виды. Межвидовой анализ продемонстрировал как синергетические, так и антагонистические взаимодействия между различными изолятами, что подчёркивает сложность микробных сообществ, формирующихся в зубном камне.

Проверка устойчивости биоплёнок к антибиотикам (ампициллин, хлорамфеникол) выявила частичную чувствительность большинства видов и сохранение высокой OD_{590} у отдельных изолятов, таких как *Streptococcus mutans и Streptococcus anginosus*. Это свидетельствует о выраженной резистентности биоплёнок и необходимости учёта этой формы при выборе тактики терапии.

Таким образом, результаты проведённого исследования убедительно демонстрируют, что зубной камень представляет собой сложную и устойчивую микробную экосистему, основу которой составляют биоплёночные формы бактерий, обладающие высокой степенью структурной организации, защитными свойствами и выраженной резистентностью к антимикробной терапии. Эти микроорганизмы не только участвуют в поддержании хронического воспаления в тканях пародонта, но и могут служить резервуаром для повторного инфицирования.

Полученные данные имеют важное практическое и клиническое значение и могут быть использованы в качестве научной базы для разработки более эффективных методов диагностики, профилактики и лечения биоплёнко-ассоциированных заболеваний полости рта. В частности, они подчеркивают необходимость создания подходов, ориентированных на разрушение биоплёнок, ингибирование их формирования и повышение эффективности антибактериальных препаратов в условиях биоплёночного роста.

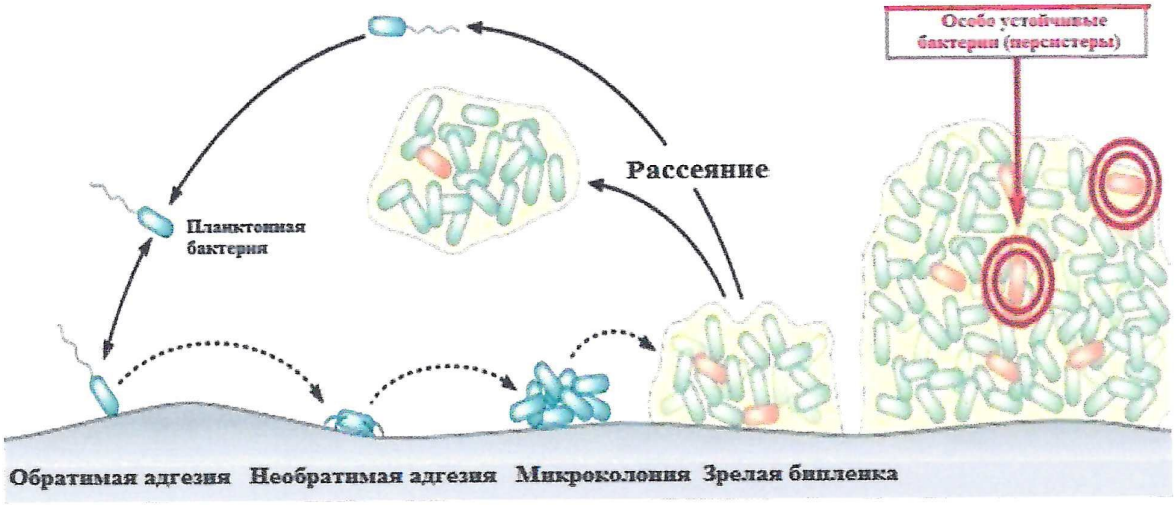


Рисунок 12. Стадии формирования биопленок [D. Lebeaux et al., 2014].

ВЫВОДЫ

1. Из зубного камня были выделены и идентифицированы 15 различных изолятов: *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei, Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, Streptococcus oralis, Streptococcus mitis, Streptococcus anginosus, Lactobacillus fermentum, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus constellatus, Staphylococcus hominis, Streptococcus salvarius, Lactobacillus gasseri и Streptococcus haemolyticus*.
2. Большинство представленных видов являлись грамположительными, формировали характерные гладкие, выпуклые колонии, у ряда видов отмечалась влажная, слизистая консистенция, проявляли признаки активного роста в жидкой среде и не обладали подвижностью.
3. Все виды обладали способностью к биопленкообразованию, более 70% видов продемонстрировали высокую (плотную) степень биоплёнкообразования по шкале Stepanovic.
4. Наиболее активными биоплёнкообразователями среди всех протестированных изолятов оказались виды *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus hominis*, что позволяет рассматривать их как потенциально доминирующие виды в микробиоте зубного камня.
5. Повышенная способность исследованных бактерий к биопленкообразованию может играть ключевую роль в процессе формирования зубных камней.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БП – биоплёнка.

КФ – кристаллический фиолетовый (краситель, используемый для количественной оценки биоплёнок).

ИНП – инкубация при нормальных условиях (обычно 37 °C, 24 ч).

ПК – положительный контроль.

ОК – отрицательный контроль.

шт. – штамм (вариант бактерии одного вида, выделенный в культуре).

$см^3$ / мл – кубический сантиметр / миллилитр.

нм – нанометр.

ч – час.

мкм – микрометр.

в/в – внутривенно (в контексте фармакологических характеристик).

in vitro – в лабораторных условиях (вне организма).

in vivo – в условиях живого организма.

EtOH – этанол (спирт), использовался для растворения кристаллического фиолетового.

СП – среда посева.

ФМ – фотометрия (метод количественного измерения OD).

ДК – дисперсионное кольцо (иногда наблюдается при росте бактерий в МПБ).

OD_{590} – оптическая плотность при длине волны 590 нм.

МПА – мясо-пептонный агар.

МПБ – мясо-пептонный бульон.

Гр+ / Гр– – грамположительные / грамотрицательные микроорганизмы.

QS (quorum sensing) – система межклеточной коммуникации бактерий, основанная на плотности популяции.

CFU (Colony Forming Units) – колониеобразующие единицы.

EPS (Extracellular Polymeric Substances) – внеклеточные полисахариды, формирующие матрикс биоплёнки.

MIC (Minimum Inhibitory Concentration) – минимальная ингибирующая концентрация антибиотика.

AB – антибиотик.

λ – длина волны (в нанометрах).

SD (Standard Deviation) – стандартное отклонение.

A-F – буквенные обозначения индивидуальных изолятов, использованных в микропланшетных экспериментах.

Шкала Stepanovic – классификация уровня биоплёнообразования по OD_{590} (нет/слабая, умеренная, плотная).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балмасова И. П., Царев В. Н., Янушевич О. О., Маев И. В., Мкртумян А. М., Арутюнов С. Д. Микроэкология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов. – Москва: Практическая медицина, 2021. – 258 с.

2. Беляев В. С., Червинец В. М., Червинец Ю. В., Григорьянц Э. О., Леонтьева А. В., Стулов Н. М. Микробиота полости рта здоровых людей и больных хроническим генерализованным пародонтитом // Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 49.

3. Беляев В. С., Червинец В. М., Червинец Ю. В., Козлова Е. А., Григорьянц Э. О., Леонтьева А. В. и др. Способность к адгезии микробиоты, выделенной у здоровых людей и больных хроническим генерализованным пародонтитом // Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 49-50.

4. Глинкин В. В., Клемин В. В., Бурховецкий В. В. Особенности химического состава биопленки здоровых и пораженных кариозным процессом зубов // Университетская клиника. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-himicheskogo-sostava-bioplenki-zdorovyh-i-porazhennyh-karioznym-protsessom-zubov (дата обращения: 20.04.2025).

5. Демин А. А. Инфекционный эндокардит и инфекция внутрисердечных устройств. Клинические рекомендации 2021 // Российский кардиологический журнал. – 2022. – Т. 27. – №. 10. – С. 113-192.

6. Елизова Л. А., Атрушкевич В. Г., Орехова Л. Ю. Новая классификация заболеваний пародонта // Пародонтология. – 2021. – Т. 26. – № 1. – С. 80-82.

7. Леонтьева А. В., Потоцкая Л. А., Червинец Ю. В. Механизмы образования микробных биопленок в полости рта у здоровых людей и

больных хроническим генерализованным пародонтитом // Пародонтология. – 2023. – Т. 28. – №. 3. – С. 208-217.

8. Рыбальченко О. В., Бондаренко В. М., Орлова О. Г. Ультраструктура микробных биоплёнок при межклеточных взаимоотношениях бактерий в сообществах // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 91(4). – С. 87-92.

9. Стрельникова Н. В. Феномен симультанной вегетации условно-патогенных микроорганизмов полости рта при хронических пародонтитах с рецидивирующим течением // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2023. – №. 1 (91). – С. 64-69.

10. Тишков Д. С. Клинический эффект фитопрепарата для блокирования роста биопленки кариосогенных микроорганизмов // Региональный вестник. – 2020. – №. 9. – С. 3-4.

11. Хабадзе З. С. Заболевание пародонта–местная антисептическая терапия: проблема эффективности. Обзор литературы // Медицинский алфавит. – 2021. – №. 2. – С. 24-37.

12. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии – основной фактор возникновения и развития пародонтита // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – №5. – С. 101-112.

13. Червинец В. М., Червинец Ю. В., Леонтьева А. В., Беляев В. С., Стулов Н. М., Родионов А. А. и др. Особенности микробиоты полости рта больных с хроническим генерализованным пародонтитом у жителей Тверского региона // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2021. – № 8. – С. 16-23.

14. Чуйкин С.В. и др. Исследование пародонтопатогенной микрофлоры методом полимеразной цепной реакции у детей с врожденной расщелиной неба и дефектом после уранопластики // Стоматология детского возраста и профилактика. – 2022. – №1(81). – С. 19-28.

15. Benoit D. S. W., Sims K. R. Jr., Fraser D. Наночастицы для лечения оральных биоплёнок // ACS Nano. – 2019. – Т. 13. – № 5. – С. 4869-4875.

16. Berger D., Rakhamimova A., Pollack A., Loewy Z. Оральные биоплёнки: развитие, контроль и анализ // High Throughput. – 2018. – Т. 7. – № 3. – С. 24.

17. Bjarnsholt T., Buhlin K., Dufrêne Y. F., Gomelsky M., Moroni A., Ramstedt и др. Формирование биоплёнок: чему нас научили последние исследования // J Intern Med. – 2018. – Т. 284. – № 4. – С. 332-345.

18. Bowen W. H., Burne R. A., Wu H., Koo H. Оральные биоплёнки: патогены, матрикс и полимикробные взаимодействия в микроокружениях // Trends Microbiol. – 2018. – Т. 26. – № 3. – С. 229-242.

19. Bui F. Q., Almeida-da-Silva C. L. C., Huynh B., Trinh A., Liu J., Woodward J. и др. Связь между пародонтопатогенами и системными заболеваниями // Biomed J. – 2019. – Т. 42. – № 1. – С. 27-35.

20. Dahlen G., Basic A., Bylund J. Значение факторов вирулентности для персистенции оральных бактерий в воспалённой десневой борозде и в патогенезе пародонтита // J Clin Med. – 2019. – Т. 8. – № 9. – С. 1339.

21. Engel A. S., Kranz H. T., Schneider M., Tietze J. P., Piwowarcyk A., Kuzius T. и др. Формирование биоплёнок на различных стоматологических реставрационных материалах // BMC Oral Health. – 2020. – Т. 20. – № 1. – С. 162.

22. Fine D. H., Patil A. G., Velusamy S. K. Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa): мифы и недопонимание его роли в агрессивном пародонтите // Front Immunol. – 2019. – Т. 10. – С. 728.

23. Flemming H. C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S. A., Kjelleberg S. Биоплёнки: новая форма существования бактерий // Nat Rev Microbiol. – 2016. – Т. 14. – С. 563-575.

24. Flemming H. C., Wuertz S. Бактерии и археи на Земле и их распространённость в составе биоплёнок // Nat Rev Microbiol. – 2019. – Т. 17. – № 4. – С. 247-260.

25. Griffen A.L., Becker M.R., Lyons S.R., Moeschberger M.L., Leys E.J. Prevalence of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status // J Clin Microbiol. – 1998. – Vol. 36, No. 11. – P. 3239-3242.

26. Huo Y. B., Chan Y., Lacap-Bugler D. C., Mo S., Woo P. C. Y., Leung W. K. и др. Мультилокусный секвенционный анализ оральных штаммов Treponema // Appl Environ Microbiol. – 2017. – Т. 83. – № 3. – С. e02499-16.

27. Jiao Y., Tay F. R., Niu L. N., Chen J. H. Современные антимикробные стратегии управления оральными биоплёночными инфекциями // Int J Oral Sci. – 2019. – Т. 11. – № 3. – С. 28.

28. Junges R., Sturød K., Salvadori G., Åmdal H. A., Chen T., Petersen F. C. Характеристика сигнальной системы Streptococcus mitis для межвидовой коммуникации с Streptococcus pneumoniae // Appl Environ Microbiol. – 2019. – Т. 85. – № 2. – С. e02297-18.

29. Kassebaum N. J., Bernabé E., Dahiya M., Bhandari B., Murray C. J., Marcenes W. Глобальное бремя тяжёлого пародонтита в 1990–2010 гг.: систематический обзор и метарегрессия // J Dent Res. – 2014. – Т. 93. – № 11. – С. 1045-1053.

30. Kilian M., Chapple I. L., Hannig M., Marsh P. D., Meuric V., Pedersen A. M. и др. Оральный микробиом: обновлённые данные для специалистов в области стоматологии // Br Dent J. – 2016. – Т. 221. – № 10. – С. 657-666.

31. Kim D., Ito T., Hara A., Li Y., Kreth J., Koo H. Antagonistic interactions by a high H_2O_2-producing commensal streptococcus modulate caries development by Streptococcus mutans // Mol Oral Microbiol. – 2022. – Vol. 37, No. 6. – P. 244-255. PMID: 36156446.

32. Kinane D. F., Stathopoulou P. G., Papapanou P. N. Заболевания пародонта // Nat Rev Dis Primers. – 2017. – Т. 3. – С. 17038.

33. Krzyściak W., Jurczak A., Kościelniak D., Bystrowska B., Skalniak A. Вирулентность Streptococcus mutans и способность к формированию

биоплёнок // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2014. – Т. 33. – № 4. – С. 499-515.

34. Lamont R. J., Koo H., Hajishengallis G. Оральная микробиота: динамические сообщества и взаимодействие с хозяином // Nat Rev Microbiol. – 2018. – Т. 16. – № 12. – С. 745-759.

35. Lopez R., Hujoel P., Belibasakis G. N. Предполагаемые патогены пародонта: эпидемиологическая перспектива // Virulence. – 2015. – Т. 6. – № 3. – С. 249-257.

36. Maekawa T., et al. Porphyromonas gingivalis manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis // Cell Host Microbe. – 2014. – Vol. 15, No. 6. – P. 768-778.

37. Mendez K. N., Hoare A., Soto C., Bugueno I., Olivera M., Meneses и др. Вариабельность геномных и вирулентных свойств штаммов Porphyromonas gingivalis, выделенных у здоровых и больных с хроническим пародонтитом // Front Cell Infect Microbiol. – 2019. – Т. 9. – С. 246.

38. Meuric V., Le Gall-David S., Boyer E., Acuna-Amador L., Martin B., Bing Fong S. и др. Подпись микробного дисбиоза при пародонтите // Appl Environ Microbiol. – 2017. – Т. 83. – № 14. – С. e00462-17.

39. Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R. Quorum sensing и фитохимические вещества // Int J Mol Sci. – 2013. – Т. 14. – № 6. – С. 12607-12619.

40. Nibali L., Bayliss-Chapman J., Almofareh S. A., Zhou Y., Divaris K., Vieira A. R. Наследуемость пародонтита: систематический обзор // J Dent Res. – 2019. – Т. 98. – № 6. – С. 632-641.

41. Olsen I., Lambris J. D., Hajishengallis G. Porphyromonas gingivalis нарушает гомеостаз хозяина и комменсалов, изменяя функцию комплемента // J Oral Microbiol. – 2017. – Т. 9. – № 1. – С. 1340085.

42. Parashar A., Parashar S., Zingade A., Gupta S., Sanikop S. Межвидовая коммуникация в оральных биоплёнках: океан информации // Oral Science International. – 2015. – Т. 12. – № 2. – С. 37-42.

43. Pérez-Chaparro P. J., Gonçalves C., Figueiredo L. C., Faveri M., Lobão E., Tamashiro N. и др. Новые патогены, ассоциированные с пародонтитом: систематический обзор // J Dent Res. – 2014. – Т. 93. – № 9. – С. 846-858.

44. Pérez-Chaparro P. J., Gonçalves C., Figueiredo L. C., Faveri M., Lobão E., Tamashiro N. и др. Новые патогены, ассоциированные с пародонтитом: систематический обзор // J Dent Res. – 2014. – Т. 93. – № 9. – С. 846-858.

45. Rocco C. J., Bakaletz L. O., Goodman S. D. Блокирование белка HUβ предотвращает проникновение Porphyromonas gingivalis в существующие биоплёнки // J Bacteriol. – 2018. – Т. 200. – № 11. – С. e00790-17.

46. Römling U., Kjelleberg S., Normark S., Nyman L., Uhlin B. E., Åkerlund B. Формирование микробных биоплёнок: необходимость действий // J Intern Med. – 2014. – Т. 276. – № 2. – С. 98-110.

47. Rosier B. T., Marsh P. D., Mira A. Устойчивость оральной микробиоты в здоровье: механизмы предотвращения дисбиоза // J Dent Res. – 2018. – Т. 97. – № 4. – С. 371-380.

48. Sintim H. O., Gürsoy U. K. Биоплёнки как «связующее звено» между стоматологией и системной медициной: новые возможности для биомаркеров и эрадикации бактерий // OMICS. – 2016. – Т. 20. – № 1. – С. 3-11.

49. Sztukowska M.N., et al. Community development between Porphyromonas gingivalis and Candida albicans mediated by InlJ and Als3 // mBio. – 2018. – Vol. 9, No. 2. – e00202-18.

50. Van Dyke T.E., et al. The nexus between periodontal inflammation and dysbiosis // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 511.

51. Velsko I. M., Shaddox L. M. Долговременный рост оральных субгингивальных биоплёнок in vitro при здоровом и болезненном состоянии // BMC Microbiol. – 2018. – Т. 18. – № 1. – С. 70.

52. Wilbert S.A., Mark Welch J.L., Borisy G.G. Spatial ecology of the human tongue dorsum microbiome // Cell Rep. – 2020. – Vol. 30, No. 12. – P. 4003-4015.e3.

53. Yan Z., Jingmei Y., Dingyu D., Yi X. Исследование микробиоты полости рта (на китайском языке) // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2014. – Т. 32. – № 6. – С. 625-630.

54. Zhou L., Slamti L., Lereclus D., Raymond B. Оптимальный ответ на сигналы quorum sensing в зависимости от среды и размера популяции патогенов // mBio. – 2020. – Т. 11. – № 3. – С. e00535-20.

55. Zijnge V., van Leeuwen M. B., Degener J. E., Abbas F., Thurnher T., Gmur F. и др. Архитектура оральных биоплёнок на естественных зубах // PLoS One. – 2010. – Т. 5. – № 2. – С. e9321.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ
ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Обучающийся Хасанова Надия Сагитовна группы БМ-201
Выпускная квалификационная работа на тему: «Образование биопленок бактериями изолированными из зубного камня»

Обучающийся Хасанова Надия Сагитовна успешно закончила курс обучения по направлению подготовки 06.04.01. Биология (магистратура). Итогом обучения явилось выполнение выпускной квалификационной работы, которая является исследовательской работой обучающегося.

При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования и анализа данных источников литературы, а также обобщения полученной информации. В процессе выполнения экспериментальной части были проведены самостоятельные исследования, освоены методы группировки, сравнения и другие. Тема раскрыта полно, выводы отражают основные результаты исследования и могут быть использованы в практической деятельности.

В период выполнения выпускной квалификационной работы обучающийся показала себя трудолюбивым, добросовестным исследователем, проявила самостоятельность и творческую инициативу.

Работа отвечает требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, аккуратно оформлена и может быть рекомендована к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология (магистратура).

Научный руководитель
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и
прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России _____ Баймиев Ал.Х
(подпись)

Подпись Баймиева А.Х.
Заверяю:
Ученый секретарь ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России _____
подпись

ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА
О ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ

обучающегося Хасановой Надии Сагитовны группы БМ-201 ФПМ
по теме: «Образование биопленок бактериями изолированными из зубного камня».

Целью данной работы являлось приобретение навыков по сбору и обработке биологической информации, умений обобщать результаты исследования в конкретные выводы и предложения, проявление творческого подхода к решению проблемы, подготовка к самостоятельной работе по специальности. Тема и содержание выпускной квалификационной работы соответствуют положениям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01. Биология (магистратура). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, сравнения и др. Работа выполнена на должном научном уровне, тема раскрыта достаточно полно, сделаны выводы. При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования литературных данных, их обобщения и анализа. Обзор литературы написан профессионально грамотно, так как автором учтены требования действующих нормативных и правовых актов, использованы материалы, опубликованные за последние пять лет. Экспериментальная часть содержит результаты самостоятельных исследований по изучаемой теме, которая являлась базой производственной практики обучающихся. Для решения поставленных задач обучающимся была проявлена личная творческая инициатива в сборе информации, выполнены расчеты, произведен анализ результатов исследований и сделаны выводы. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований.

Работа проиллюстрирована таблицами и рисунками, оформлена аккуратно, практически отсутствуют ошибки, материал изложен четко и грамотно. Результаты проведенной работы имеют практическую значимость. На основании вышеизложенного считаю, что работа может быть допущена к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология.

Рецензент:
к.б.н., научный сотрудник лаборатории
биоинженериирастений и микроорганизмов
ИБГ УФИЦ РАН

Лавина А.М. (подпись)

Дата _____

ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА
О ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ

обучающегося Хасановой Надии Сагитовны группы БМ-201 ФПМ
по теме: «Образование биопленок бактериями изолированными из зубного камня».

Целью данной работы являлось приобретение навыков по сбору и обработке биологической информации, умений обобщать результаты исследования в конкретные выводы и предложения, проявление творческого подхода к решению проблемы, подготовка к самостоятельной работе по специальности. Тема и содержание выпускной квалификационной работы соответствуют положениям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01. Биология (магистратура). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, сравнения и др. Работа выполнена на должном научном уровне, тема раскрыта достаточно полно, сделаны выводы. При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования литературных данных, их обобщения и анализа. Обзор литературы написан профессионально грамотно, так как автором учтены требования действующих нормативных и правовых актов, использованы материалы, опубликованные за последние пять лет. Экспериментальная часть содержит результаты самостоятельных исследований по изучаемой теме, которая являлась базой производственной практики обучающихся. Для решения поставленных задач обучающимся была проявлена личная творческая инициатива в сборе информации, выполнены расчеты, произведен анализ результатов исследований и сделаны выводы. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований.

Работа проиллюстрирована таблицами и рисунками, оформлена аккуратно, практически отсутствуют ошибки, материал изложен четко и грамотно. Результаты проведенной работы имеют практическую значимость. На основании вышеизложенного считаю, что работа может быть допущена к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология.

Рецензент:
к.б.н., доцент кафедры
фундаментальной и
прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России _____ Мочалов К.С.

Дата _____

Заверяю:
Ученый секретарь ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России _____
подпись

АНТИПЛАГИАТ
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

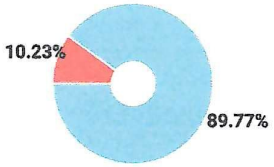
ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Хасанова Надия Сагитовна
Самоцитирование рассчитано для: Хасанова Надия Сагитовна
Название работы: ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ ИЗОЛИРОВАННЫМИ ИЗ ЗУБНОГО КАМНЯ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ

РЕЗУЛЬТАТЫ

СОВПАДЕНИЯ	10.23%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	89.77%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 19.06.2025



Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.7-68, 74-75, введение с.4-6, выводы с.69-74

Модули поиска: Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Цитирование; Переводные заимствования; Рувики; Публикации РГБ; ИПС Адилет; Патенты СССР, РФ, СНГ; IEEE; СМИ России и СНГ; Публикации РГБ (переводы и перефразирования); Диссертации НББ; Медицина; Коллекция НБУ; Публикации eLIBRARY; Сводная коллекция ЭБС; Перефразирования по коллекции IEEE; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Переводные заимствования IEEE; Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования); Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Кольцо вузов (переводы и перефразирования); Переводные заимствования по коллекции Интернет в...

Работу проверил: Халитова Рита Камилевна

ФИО проверяющего

Дата подписи: 23.06.2025г.

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Подпись проверяющего

Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.

АНТИПЛАГИАТ
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - http://bashgmu.antiplagiat.ru

Отчет о проверке

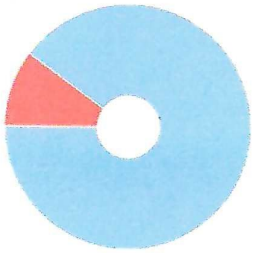
Автор: Хасанова Надия Сагитовна

Название документа: ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ ИЗОЛИРОВАННЫМИ ИЗ ЗУБНОГО КАМНЯ

Проверяющий: Халитова Рита Камилевна

Организация: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ



Совпадения: 10,23%

Оригинальность: 89,77%

Цитирования: 0%

Самоцитирования: 0%

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

Проверено: 88,96% текста документа, исключено из проверки: 11,04% текста документа. Разделы, отключенные пользователем: Титульный лист, Содержание, Библиография, Приложение

- **Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- **Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» – это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- **Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- **Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- **Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- **Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 4853

Тип документа: Выпускная квалификационная работа

Дата проверки: 19.06.2025 15:27:44

Дата корректировки: Нет

Количество страниц: 82

Символов в тексте: 124856

Слов в тексте: 14445

Число предложений: 2580

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Исключение элементов документа из проверки: Нет

Выполнено распознавание текста (OCR): Нет

Выполнена проверка с учетом структуры: Да

Модули поиска: Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Цитирование, Переводные заимствования, Рувики, Публикации РГБ, ИПС Адилет, Патенты СССР, РФ, СНГ, IEEE, СМИ России и СНГ, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Диссертации НББ, Медицина, Коллекция НБУ, Публикации eLIBRARY, Сводная коллекция ЭБС, Перефразирования по коллекции IEEE, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: аналитика, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные заимствования IEEE, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Интернет Плюс, Собственная коллекция компании, Собственная коллекция (переводы и перефразирования)

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	2,71%	0,83%	posobie._.Bioplenki._.Mardanova.... https://kpfu.ru	14 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[02]	2,49%	1,28%	https://kpfu.ru/portal/docs/F1250... https://kpfu.ru	13 Апр 2022	Интернет Плюс	
[03]	2,49%	0%	https://kpfu.ru/portal/docs/F1250... https://kpfu.ru	23 Апр 2024	Интернет Плюс	
[04]	2,49%	0%	https://kpfu.ru/portal/docs/F1250... https://kpfu.ru	29 Янв 2019	Интернет Плюс	
[05]	2,49%	0%	posobie._.Bioplenki._.Mardanova.... https://kpfu.ru	14 Окт 2024	Интернет Плюс	
[06]	2,41%	2,21%	Механизмы образования микро...	18 Окт 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[07]	2,3%	0,64%	ВКР_ТарасенкоВО_16Физ(б)ФКС_...	08 Июн 2020	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[08]	1,86%	1,37%	794-2368-1-PB.pdf https://parodont.ru	06 Дек 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[09]	1,4%	0,09%	ВКР_ТарасенкоВО_16Физ(б)ФКС_...	08 Июн 2020	Кольцо вузов	
[10]	1,26%	0,97%	Влияние магнитных взаимодейс...	16 Июн 2019	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[11]	1,25%	0%	???_ ??????????? ????? ????????????.pdf https://repo.bashgmu.ru	27 Ноя 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[12]	1,22%	0,71%	ВКР_АбдрахимоваРА_15Био(ба)М...	17 Июн 2019	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[13]	0,8%	0%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[14]	0,7%	0,1%	ВКР_Степанова АВ_17Био(ба)Мб_...	22 Июн 2021	Кольцо вузов	
[15]	0,58%	0%	ВКР_Степанова АВ_17Био(ба)Мб_...	22 Июн 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[16]	0,57%	0%	posobie._.Bioplenki._.Mardanova.... https://kpfu.ru	14 Окт 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[17]	0,53%	0%	ВКР_19Био(м)МВ_СилкинаТА_22.0...	20 Июн 2021	Кольцо вузов	
[18]	0,53%	0%	ВКР_15Био(ба)МБ_Силкина ТА_27...	17 Июн 2019	Кольцо вузов	
[19]	0,47%	0,22%	Механизмы образования микро...	18 Окт 2023	Публикации eLIBRARY	

[20]	0,47%	0,24%	http://www.kstom.ru/ks/issue/dow... http://kstom.ru	31 Мая 2025	Интернет Плюс	
[21]	0,46%	0,12%	Клиническое значение представ... https://moluch.ru	18 Июн 2025	Интернет Плюс	
[22]	0,4%	0%	Изучение биопленок, образован... http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY	
[23]	0,27%	0%	Современные достижения молод... http://elibrary.ru	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY	
[24]	0,26%	0,26%	Биопленки как базовая форма су...	27 Апр 2025	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[25]	0,26%	0,26%	Повышение эффективности фото...	04 Июн 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[26]	0,25%	0%	794-2368-1-PB.pdf https://parodont.ru	06 Дек 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,25%	0,25%	A Survey of Molecular Communica... https://ieeexplore.ieee.org	15 Мар 2021	Переводные заимствования IEEE	
[28]	0,24%	0,24%	Особенности микробиома ротов... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY	
[29]	0,23%	0,23%	Изучение биопленок, образован... http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[30]	0,23%	0%	https://europepmc.org/backend/p... https://europepmc.org	20 Авг 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[31]	0,23%	0%	https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/artic... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	29 Мая 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[32]	0,21%	0,21%	Evaluating pH and Temperature E... https://ieeexplore.ieee.org	24 Мар 2025	Переводные заимствования IEEE	
[33]	0,21%	0%	https://shelly.kpfu.ru/e-ksu/docs/... https://shelly.kpfu.ru	04 Фев 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[34]	0,18%	0%	Абдуллаева, Асият Мухтаровна Н... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2021	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,17%	0%	????????? ????? ?????????.pdf https://repo.bashgmu.ru	10 Мая 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,17%	0%	https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/artic... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	13 Мар 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,15%	0%	???_ ??????????? ????? ???????????.pdf https://repo.bashgmu.ru	27 Ноя 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,12%	0%	Самоукина, Анна Михайловна Ба... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,1%	0%	Хабипова, Наиля Наилевна Роль ... http://dlib.rsl.ru	19 Сен 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.