



УДК 579.262:001.891

MODERN METHODS OF BIOFILM RESEARCH**СУЧАСНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОПЛІВКИ****Zabolotna I.I. / Заболотна І.І.***c.med.s., as. prof. / к.мед.н., доц.*

ORCID: 0000-0002-3284-0392, Scopus ID: 57225012445, Researcher ID: GXM-5946-2022

Donetsk National Medical University, Liman, Privokzalna, 27, 84404

Донецький національний медичний університет, Лиман, Привокзальна, 27, 84404

Анотація. Біоплівка є переважною формою росту більшої кількості мікроорганізмів. У даній роботі представлений огляд сучасних наукових публікацій, що стосуються методів її дослідження. Доведено, що стандартна мікробіологічна діагностика у клінічній практиці має бути доповнена доступними, швидкими та інформативними методами аналізу біоплівки. Але більшість розглянутих методів використовується в основному лише у наукових дослідженнях і не знаходить застосування у клінічній практиці. Вивчення особливостей біоплівки має велике значення для подальшого обґрунтування вибору засобів індивідуальної гігієни порожнини рота і комплексного лікування і профілактики стоматологічної патології.

Ключові слова: біоплівка, мікроорганізми, порожнина рота

Вступ.

Порожнина рота людини уявляє собою другий за різноманітністю мікробіом в організмі, який містить понад 700 видів бактерій, і відрізняється надзвичайно сприятливими умовами для росту і розмноження мікрофлори за рахунок лужної реакції середовища, наявності залишків їжі, оптимальної вологості і сприятливої температури [1]. Переважною формою існування більшої кількості мікроорганізмів, особливо патогенних, є біоплівка (biofilm), яка відіграє головну роль в етіології стоматологічних захворювань. Накопичуючись у дентальній біоплівці (сукупність зубного нальоту і каменю), що складається з полімікробних співтовариств, популяції мікроорганізмів розвиваються послідовно, вони тісно пов'язані з внутрішнім середовищем організму і його оточенням, чутко реагуючи на їх стан [2]. Якщо у складі біоплівки превалюють кислотопродуруючі мікроорганізми, баланс процесів демінералізації/ремінералізації зміщується у бік довготривалих епізодів зниження рН, що призводить до втрати мінеральної компоненти зубів [3]. Біоплівки, які формуються грибами, швидко колонізуються представниками бактеріальної мікробіоти, багато з яких володіють високим патогенним потенціалом [4]. Для дентальної біоплівки характерна така властивість, як саморегуляція. Її архітектура і функції індивідуальні навіть при подібному бактеріальному складі, а сама біоплівка в нормі знаходиться у метаболічно рівноважному стані [5]. Її склад залежить від локалізації (над'яснева і під'яснева) і анатомічної ділянки порожнини рота. У біоплівках на верхній щелепі частіше мешкають стрептококи і лактобацили, на нижній щелепі - вейлонели і ниткоподібні бактерії [5]. Мікробні метаболічні взаємодії та міжвидова комунікація є важливими аспектами виживання співтовариств, які також можуть бути об'єктом антимікробних стратегій, що ґрунтуються на екологічному розумінні біоплівок [6]. Отже, вивчення особливостей їх формування, обумовлених плівкоутворюючими штамми, є одним із важливих питань сучасної медицини і біології.



Основний текст

Ідентифікація біоплівки заснована на візуалізації принаймні двох із наступних трьох обов'язкових критеріїв: прикріплення мікроорганізмів до поверхні; структуровані зборки мікробних клітин; наявність екзополімерного матриксу [6, 7]. Для того, щоб довести присутність біоплівки, використовують різноманітні методичні підходи, спрямовані на виявлення: елементів біоплівкового позаклітинного матриксу; генів, що контролюють біоплівкоутворення; складних архітектурних структур, специфічних для неї. Попередньо проводять видову ідентифікацію мікроорганізмів, що формують біоплівку [7].

Але дентальні біоплівки мають складну багаторівневу тривимірну організацію, яка ускладнює їхнє вивчення. Існує досить велика кількість методів, що дозволяють провести візуалізацію мікробних співтовариств, які сформувались. До них відносяться електронна мікроскопія і конфокальна лазерна скануюча мікроскопія (CLSM) [8]. Самим наочним методом візуалізації матриксу, а отже виявлення біоплівки, є електронна мікроскопія [7]. Скануюча електронна мікроскопія (SEM) з 2D-візуалізацією дозволяє проводити цитоморфологічні дослідження складу під'ясневої біоплівки. SEM з 3D-візуалізацією використовують для кращого вивчення морфології мікроорганізмів та архітектоники непорушеної під'ясневої мікробної біоплівки [6]. Більш удосконаленим є специфічне офарблення матриксних біополімерів за допомогою спеціальних наборів флуоресцентних фарбників (наприклад, «FilmTracer™ Sypro® Biofilm Matrix Stain», Invitrogen), позиціонованих фірмами-виробниками в якості препаратів для виявлення матриксу [7].

Але традиційно у мікробіологічних дослідженнях розглядаються результати вивчення планктонних бактеріальних клітин. Ідентифікацію чистих виділених культур проводять за морфологічними, тінкторіальними, культуральними та біохімічними ознаками, користуючись класифікаційною схемою Bergey [3]. Прийнято вважати за «критичне число» для бактерій $> 10^5$ в 1 мл, у деяких випадках $> 10^4$; для грибів, анаеробів і найпростіших воно $> 10^3$ - 10^4 . Існуючі методи визначення КУО розроблені тільки для планктонних форм бактерій без урахування здібності мікроорганізмів формувати біоплівку, що знижує достовірність отриманих результатів [8]. Існують також тест-систем для ідентифікації мікроорганізмів, розробкою яких займаються багато відомих виробників. Не дивлячись на деякі недоліки методу (відносна тривалість досліджень, при використанні складних діагностичних середовищ при культивуванні вимогливих мікроорганізмів – висока ціна), переваги (висока чутливість і точність, можливість отримання даних про кількість мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі і чутливості до антимікробних препаратів) роблять його основним у практиці бактеріологічних лабораторій у цей час [8]. Застосування молекулярно-генетичних технологій дозволяє виявити та ідентифікувати патогенні мікроорганізми з використанням методів молекулярної гібридизації, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), рестрикційного аналізу хромосомної і плазмидної ДНК. Перспективним виглядає ПЛР, за допомогою якого можна зробити заключення про вірогідність



наявності мікроорганізму-збудника в досліджуваному матеріалі без виділення чистої культури [9].

Нове системне сприйняття стало можливим з появою сучасних технологій діагностики мікробних скупчень, що дозволило розвивати і вдосконалювати методи профілактики і лікування полімікробних захворювань [10]. У клінічній практиці стандартна мікробіологічна діагностика має бути доповнена доступними, швидкими та інформативними методами аналізу бактеріальної біоплівки. При цьому бакпосів може бути використаний для виділення культури бактерій, що входять до її складу [11]. У вирощуванні мікробних співтовариств домінують два напрямки досліджень: культивування у динамічних (імітація природних умов проживання мікроорганізмів) і статичних умовах [8]. До динамічних можна віднести методи з використанням біореакторів (лабораторних ферментерів). Загальна сутність методів полягає у культивуванні мікроорганізмів у поживному середовищі без додавання додаткових живильних речовин [8]. Саме мікроскопічне спостереження за живою біоплівкою у режимі реального часу дозволило виявити особливий вид хаотичного (теплого) руху стафілококів, що перебувають у її складі. Деякі стафілококи, будучи мікроскопічними частинками, здійснюють хаотичні коливання всередині обмеженого обсягу, порівнянного з їх розмірами. При цьому стафілококи можуть не мати прямих контактів із сусідніми клітинами. На відміну від класичного броунівського руху, переміщення стафілококів обмежені. Це свідчить про те, що стафілококи механічно пов'язані між собою, що є непрямим підтвердженням існування необхідного атрибуту будь-якої біоплівки - позаклітинного матриксу, який пов'язує біоплівкові мікроорганізми між собою і з поверхнею, що підлягає [7]. Основною перевагою динамічних методів формування біоплівок є максимальне приближення до умов живих систем [8]. Дослідження, проведені на біоплівках у їх природному стані, показали, що існують великі відмінності у поведінці бактерій в лабораторних умовах і в їх природних екосистемах. Наприклад, бактерія у біоплівках виробляє такі речовини, які вона не продукує у планктонній культурі. Крім того, матрикс навколо мікроколонії служить захисним бар'єром [12]. Також існує більш складна модель вивчення біоплівки, яка отримала назву мікрокосмос (microcosm), що максимально близько імітує природні умови утворення матриксу біоплівки. Прикладом такого варіанту є використання гідроксиапатиту і ротової рідини для формування моделі дентальної біоплівки [8]. Інша група методів заснована на створенні статичних умов культивування мікроорганізмів. Технікою, що найбільш часто використовується у цій групі, є метод з використанням пластикового посуду у різних модифікаціях. Відомі методи, засновані на сорбції молекул фарбника на структурах біоплівки з наступною їх отмивкою (десорбцією) в органічних розчинниках. Такий спосіб індикації біоплівок найбільш часто використовується у статичних методах культивування мікробних біоплівок і дозволяє дати умовну кількісну характеристику мікробним співтовариствам, що утворились [8]. Окремо розглядається метод, розроблений D.E. Kadougi з співавторами, який займає проміжне положення між статичними і динамічними методами. У ньому використовуються 6-лункові планшети, у кожній лункі яких підведена система



подачі і відводу живильного середовища. Після інкубації підключається система мікроциркуляції, яка забезпечує оптимальне надходження живильних речовин до біоплівки, що формується [8]. Вимірювання біоломінесценції (BPI) – достатньо новий метод вивчення і детекції біоплівок, який можна використовувати як *in vitro*, так і *in vivo*. При штучному введенні у бактерії плазмід, відповідальних за синтез люмінесцентного білка, можна проводити візуалізацію як адгезованих бактерій, так і матриксу біоплівки. Метод флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) став порівняно нещодавно використовуватись для вивчення біоплівок у медицині. Він часто поєднується з CLSM. Метод гібридизації використовують для детекції і визначення розташування специфічних мРНК в клітинах, що утворюють біоплівки. Це дозволяє встановити просторові-часові особливості експресії генів у бактеріях. За допомогою цього методу була визначена неоднорідність бактерій у біоплівці і визначені клітини-персистери, які відповідальні за виживання популяції під час впливу несприятливих факторів навколишнього середовища і дії антимікробних препаратів [8].

Висновки.

Виявлення певних мікроорганізмів у складі біоплівки, оцінка їх кількості, локалізації, взаємин дозволить прогнозувати перебіг захворювань органів і тканин порожнини рота з урахуванням природи їх збудника та завчасно вжити профілактичних заходів. Особливості біоплівки також мають велике значення для подальшого обґрунтування вибору засобів індивідуальної гігієни порожнини рота і комплексного лікування стоматологічної патології. Але більшість розглянутих методів її дослідження використовується лише у наукових розробках і не знайшло застосування у клінічній практиці.

Література:

1. Pathak J.L., Yan Y., Zhang Q., Wang L., Ge L. The role of oral microbiome in respiratory health and diseases. *Respir Med.* 2021;185:106475. DOI: 10.1016/j.rmed.2021.106475.
2. Катола В.М., Тарасенко С.В., Комогорцева В.Е. Влияние микробиоты полости рта на развитие воспаления и соматических заболеваний // Российский стоматологический журнал. – 2018. - 22 (3). – С. 162-165. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2018-22-3-162-165>.
3. Рожко В.І., Лучинський М.А., Петрунів В.Б., Пясецька Л.В., Рожко О.В. Мікробіологічний спектр зубного нальоту при захворюваннях шлунково-кишкового тракту в дітей // Вісник стоматології. – 2021. – № 2 (115). - Т. 40. – С. 74-77. DOI: <https://doi.org/10.35220/2078-8916-2021-40-2.14>.
4. Арутюнов А.С., Царева Т.В., Киракосян Л.Г., Левченко И.М. Особенности и значение адгезии бактерий и грибов полости рта как этапа формирования микробной биопленки на стоматологических полимерных материалах // Стоматология. – 2020. – Т. 99. - №2. – С. 79-84. DOI: <https://doi.org/10.17116/stomat20209902179>.
5. Седнева Я.Ю., Пашкова Г.С. Микробиота полости рта. Перспективы использования комплексных средств на основе бактериофагов для профилактики



заболеваний полости рта у детей // Стоматология детского возраста и профилактика. - 2018. - №5. – С. 57-60.

6. Слажнева Е.С., Елизова Л.А., Лобода Е.С., Орехова Л.Ю., Атрушкевич В.Г. Новые возможности в визуализации поддесневой микробной биопленки с помощью сканирующей электронной микроскопии // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. - № 15 (4). – С. 544-548. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15128>.

7. Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А., Гурьев Е.Л., Ломинадзе Г.Г. Современные технологии исследования бактериальных биопленок. СТМ. – 2013. - №5 (1). – С. 14-20.

8. Окулич В.К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с.

9. Доменюк Д.А., Карслиева А.Г., Быков И.М., Кочконян А.С. Оценка количественных параметров пародонтопатогенной и резидентной микрофлоры в биопленке десневой борозды у детей и подростков с зубочелюстными аномалиями // Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. - №4 (146). – С. 39-50.

10. Тончева К.Д. Біоплівка в стоматології // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2015. – Т. 15. – Вип. 4 (52). – С. 338-343.

11. Ярец Ю., Шевченко Н. Новый метод анализа бактериальной биопленки // Наука и инновации. – 2016. - №10 (164). – С. 64-68.

12. Медведєва М.Б. Порівняльна характеристика мікрофлори зубного нальоту контактних і вестибулярних поверхонь зубів // Сучасна стоматологія. – 2014. - №1. – С. 24-26.

References.

1. Pathak J.L., Yan Y., Zhang Q., Wang L., Ge L. The role of oral microbiome in respiratory health and diseases. *Respir Med.* 2021;185:106475. DOI: 10.1016/j.rmed.2021.106475.

2. Katola V.M., Tarasenko S.V., Komogortseva V.E. Effect of oral microbiota on the development of inflammation and somatic diseases. *Rossiyskii stomatologicheskii zhurnal.* 2018;22(3):162-165. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2018-22-3-162-165>.

3. Rozhko V.I., Luchynskiy M.A., Petruniv V.B., Piasetska L.V., Rozhko O.V. Microbiological spectrum of dental plaque in children with gastrointestinal tract diseases. *Bulletin of Dentistry.* 2021;2(115),4:74-77. DOI: <https://doi.org/10.35220/2078-8916-2021-40-2.14>.

4. Arutyunov AS, Tsareva TV, Kirakosyan LG, Levchenko IM. Features and significance of adhesion of bacteria and fungi of the oral cavity as the initial stage of the formation of a microbial biofilm on dental polymer materials. *Stomatologiya.* 2020;99(2):79-84. DOI: <https://doi.org/10.17116/stomat20209902179>.

5. Sedneva Ya.Yu., Pashkova G.S. Microbiota of the oral cavity. Prospects for the use of bacteriophages complex for oral diseases prevention. *Pediatric dentistry and dental profilaxis.* 2018;5:57-60.

6. Slazhneva E.S., Elizova L.A., Loboda E.S., Orekhova L.Yu., Atrushkevich V.G. New possibilities in the visualization of subgingival microbial biofilm using scanning electron microscopy. *Medical News of North Caucasus.* 2020;15(4):544-548. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15128>.

7. Chebotar I.V., Pogorelov A.G., Yashin V.A., Guryev E.L., Lominadze G.G. Modern



Technologies of Bacterial Biofilm Study. STM. 2013;5(1):14-20.

8. Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. Microbial Biofilms in Clinical Microbiology and Antibacterial Therapy. - Vitebsk: VSMU, 2017. – 300 p.

9. Domyuk D.A., Karslieva A.G., Bykov I.M., Kochkonyan A.S. Evaluation of quantitative parameters of parodontopathogenic and residential microflora in gingival sulcus biofilm in children and adolescents with dentoalveolar anomalies. Kuban Scientific Medical Bulletin; 2014;4(146):39-50.

10. Toncheva K.D. Biofilm in dentistry. Actual problems of modern medicine: Bulletin of Ukrainian Medical Stomatological Academy, 2015;15,4(52):338-343.

11. Yarets Yu., Shevchenko N. A new method for the analysis of bacterial biofilm. Science and innovation. 2016;10(164):64-68.

12. Miedviedieva M. Comparative characteristics of dental deposit microflora of contact and vestibular teeth surfaces. Actual dentistry. 2014;1:24-26.

Abstract. *Biofilm is a special form of existence of microorganisms in the oral cavity. The purpose of the presented review was to generalize modern scientific information related to the methods of its research. But many literary sources are devoted to microbiological studies of only planktonic bacterial cells. However, this is not justified. The analysis of recent publications has shown that biofilm is the predominant form of growth of a greater number of microorganisms. Growth of microbial communities is dominated by two areas of research: cultivation in dynamic and static conditions. The main advantage of dynamic methods is the maximum approximation to the conditions of living systems. There has been proven relevance of the methods that allow visualization of microbial communities, electron microscopy and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The study of biofilm features is of great importance for the further justification of the choice of individual oral hygiene products and comprehensive treatment and prevention of dental pathology. It has been proven that standard microbiological diagnostics in clinical practice should be supplemented with accessible, fast and informative methods of its analysis. But most of the considered methods are used only in scientific developments and they are not widely used in clinical practice.*

Key words: *biofilm, microorganisms, oral cavity*

Стаття відправлена: 14.05.2023 р.

© Заболотна І.І.