

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Гимранова И.А., Хакимова Л.Р., Газизуллина Г.Р., Хасанова Г.Ф., Камалова Я.А., Акмалова Г.М.

### ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *LACTOBACILLUS* SPP., ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАРОДОНТА

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 450008, г. Уфа, Россия

Заболевания пародонта являются одной из актуальных проблем современной стоматологии, требующей необходимых мер повышения эффективности профилактики и терапии. Одним из решений данной задачи является применение пробиотиков для полости рта на основе *Lactobacillus* spp.

**Цель работы** - идентификация и изучение биологических свойств *Lactobacillus* spp., выделенных у пациентов с диагнозом пародонтит и выбор штаммов-кандидатов для пробиотиков ротовой полости.

**Материал и методы.** Обследованы пациенты стоматологического профиля с диагнозом пародонтит лёгкой и средней степени тяжести, материал взят из пародонтальных карманов. Идентификацию до рода и вида проведена с помощью микробиологических методов и масс-спектрометрии, исследована адгезия выделенных штаммов к буккальному эпителию, их антагонизм к условным патогенам, анализ биоплёнок, формируемых на инертных поверхностях.

**Результаты.** Выделено 9 штаммов лактобактерий, представленные двумя морфологическими типами, идентифицируемые как *L. fermentum* и *L. casei*. Исследование позволило оценить антимикробную активность выделенных штаммов *Lactobacillus* spp. по отношению к условно-патогенным культурам *P. aeruginosa* и *S. aureus*, адгезивную способность к буккальным эпителиоцитам человека, способность к образованию биоплёнок, что определяет колонизационную резистентность слизистой оболочки полости рта.

**Обсуждение.** Установлено, что наилучшей биоплёнокообразующей способностью характеризовался штамм *L. fermentum* 7. Достаточно высокие показатели биоплёнокообразования отмечались у *L. casei* 2, *L. casei* 3, *L. fermentum* 1. Относительно слабой способностью к формированию биоплёнок характеризовались изоляты *L. fermentum* 6 и *L. casei* 9. Исходя из полученных результатов, изоляты лактобацилл, имеющие высокую способность к биоплёнокообразованию, одновременно характеризовались и высокой адгезивной способностью к буккальному эпителию.

**Заключение.** Исследованные штаммы можно рассмотреть в качестве кандидатов при создании пробиотических препаратов для повышения эффективности лекарственной терапии при лечении пародонтита, особое внимание при дальнейших исследованиях следует обратить на штамм *L. fermentum* 7.

**Ключевые слова:** *Lactobacillus* spp.; пробиотики; пародонтит; микробиом полости рта

**Для цитирования:** Гимранова И.А., Хакимова Л.Р., Газизуллина Г.Р., Хасанова Г.Ф., Камалова Я.А., Акмалова Г.М. Изучение биологических свойств *Lactobacillus* spp., выделенных у пациентов с заболеваниями пародонта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (7): 341-348.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-7-341-348>

**Для корреспонденции:** Гимранова Ирина Анатольевна, канд. мед. наук, и.о. зав. каф. фундаментальной и прикладной микробиологии; e-mail: mia8408@mail.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила	04.04.2024
Принята к печати	24.04.2024
Опубликовано	25.06.2024

Gimranova I.A., Khakimova L.R., Gazizullina G.R., Khasonova G.F., Kamalova Ya.A., Akmalova G.M.

### STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS* SPP. ISOLATED FROM PATIENTS WITH PERIODONTAL DISEASES

Bashkir State Medical University (BSMU), 450008, Ufa, Russia

Periodontal diseases are one of the pressing problems of modern dentistry, requiring the necessary measures to increase the effectiveness of prevention and therapy. One solution to this problem is the use of probiotics for the oral cavity based on *Lactobacillus* spp.

**The purpose** of this work was identification and study of the biological properties of *Lactobacillus* spp. isolated from patients diagnosed with periodontitis and selection of candidate strains for oral probiotics.

**Material and methods.** Dental patients diagnosed with mild to moderate periodontitis were examined; material was taken from periodontal pockets. Identification to genus and species was carried out using microbiological methods and mass spectrometry, the adhesion of isolated strains to the buccal epithelium, their antagonism to conditional pathogens was studied, and biofilms formed on inert surfaces were analyzed.

**Result.** 9 strains of lactobacilli were isolated, represented by two morphological types, identified as *L. fermentum* and *L. casei*. The

study made it possible to evaluate the antimicrobial activity of the isolated strains of *Lactobacillus* spp. in relation to opportunistic cultures *P. aeruginosa* and *S. aureus*, adhesive ability to human buccal epithelial cells and the ability to form biofilms, which determines the colonization resistance of the oral mucosa. It was found that the strain *L. fermentum* 7 had the best biofilm-forming ability. Quite high rates of biofilm formation were also observed in *L. casei* 2, *L. casei* 3, *L. fermentum* 1. The isolates *L. fermentum* 6 and *L. casei* 9 had a relatively weak ability to form biofilms. Based on the results obtained, lactobacilli isolates that had a high ability for biofilm formation were simultaneously characterized by a high adhesive ability to the buccal epithelium. The studied strains can be considered as candidates for the creation of probiotic preparations to increase the effectiveness of drug therapy in the treatment of periodontitis, special attention in further research should be paid to the strain *L. fermentum* 7.

**Key words:** *Lactobacillus* spp.; probiotics; periodontitis; oral microbiome

**For citation:** Gimranova I.A., Khakimova L.R., Gazizullina G.R., Khasonova G.F., Kamalova Ya.A., Akmalova G.M. Study of the biological properties of *Lactobacillus* spp. isolated from patients with periodontal diseases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (7): 341-348 (in Russ.).  
DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-7-341-348

**For correspondence:** Gimranova I.A., PhD. Sci. Med., head Department of Fundamental and Applied Microbiology BSMU; e-mail: mia8408@mail.ru

**Information about authors:**

Gimranova I.A., <https://orcid.org/0000-0003-3330-9437>;

Khakimova L.R., <https://orcid.org/0000-0003-0979-0283>;

Gazizullina G.R., <https://orcid.org/0009-0005-2508-7901>;

Hasanova G.F., <https://orcid.org/0009-0005-0867-4653>;

Kamalova Ya. A., <https://orcid.org/0009-0001-6152-9819>;

Akmalova G.M., <https://orcid.org/0000-0002-8487-1879>.

**Conflict of interest.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 04.04.2024

Accepted 24.04.2024

Published 25.06.2024

Микроорганизмы на поверхности зубов, десневой борозде, пародонтальных карманах образуют бактериальную биоплёнку [1]. Первичными колонизаторами являются *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, бактерии родов *Fusobacterium* и *Neisseria*. Они аэробы или факультативные аэробы, которые снижая уровень кислорода, позволяют анаэробным бактериям внедриться в сообщество биоплёнки в качестве вторичных колонизаторов. К вторичным колонизаторам относятся грамотрицательные микроорганизмы такие, как *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, бактерии родов *Actinomyces* и *Capnocytophaga* [2]. Если первичная биоплёнка остается целостной некоторое время, то она является благоприятной средой для прикрепления условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), таких как *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, которые отнесены к пародонтопатогенам. *P. gingivalis* образует ассоциации с факультативно-аэробными бактериями, такими как *Neisseria* spp. в качестве стратегии выживания [3, 4]. Такое нарушение равновесия состояние биоплёнок может привести к развитию патологических состояний в полости рта, в частности к пародонтиту. Пародонтит - воспалительное заболевание комплекса тканей, окружающих зуб, при котором происходит разрушение костной ткани, что может привести к подвижности и потере зубов [5]. В развитии пародонтита существенную роль играет состав микробной биоплёнки зубной бляшки и слизистой оболочки полости рта человека [6]. На начальных стадиях и при прогрессировании пародонтита микроорганизмы колонизируют пародонтальный карман, образуя поддесневые биоплёнки, которые адгезируются к поверхности

корня зуба, вызывая воспаление в пародонте [5, 7]. При тяжёлой стадии заболевания происходит деструкция костной ткани, что ведёт к прогрессирующей потере зубов. Инфекционный процесс при пародонтите вызывает воспалительную реакцию иммунной системы человека и обострение других хронических заболеваний [8]. Одной из актуальных задач современной стоматологии является повышение эффективности терапии при пародонтите. Одним из решений данной проблемы является применение специальных пробиотиков для полости рта.

Пробиотики являются живыми микроорганизмами, благотворно влияющими на здоровье человека при приёме их в достаточном количестве [9, 10]. Чаще всего в качестве пробиотических штаммов используют бактерии рода *Lactobacillus* [10, 11]. Лактобактерии составляют значительную часть популяции защитных микроорганизмов в микробиоте человека. Они являются грамположительными палочковидными анаэробами или факультативными анаэробами [12]. Лактобактерии обычно составляют менее 1% от общего пула микроорганизмов, выделенных из полости рта. Некоторые виды обнаруживаются как в фекальных, так и в оральных образцах, например, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, которые часто выделяются из образцов слюны [11]. Бактерии рода *Lactobacillus* продуцируют большое количество биологически активных веществ, таких как перекись водорода, лактоцидин, лактолин; стимулируют лимфоидный аппарат, способствуя синтезу иммуноглобулинов и выработке лизоцима [13]. В литературе описано применение пробиотика на основе *L. acidophilus* у пациентов с пародонтитом, а именно после обработки пародонталь-

ных карманов данным препаратом оценивали уровень гигиены полости рта и состояние местного иммунитета. В результате биопрепарат с нелиофилизированными штаммами лактобактерий не только положительно повлиял на клиническое состояние тканей пародонта, снижая выраженность воспаления, но и улучшал показатели местного иммунитета [13]. Пробиотики предложены и в качестве эффективного лечения кандидоза полости рта, так как показано, что лактобактерии, могут ингибировать рост биоплёнок грибов рода *Candida in vitro* [14, 15]. Приём пробиотиков снижает уровень *S. mutans* в слюне у детей [16]. У пациентов с заболеваниями пародонта пробиотик с *Lactobacillus* spp. улучшал результаты консервативной терапии, уменьшая кровоточивость десны и изменяя уровень бактерий в полости рта [17-19]. Пробиотики способствуют уменьшению неприятного запаха изо рта и улучшению качества жизни, связанного со здоровьем полости рта [20]. Постоянное краткосрочное употребление пробиотиков может замедлить возникновение кариеса у детей [21]. Использование пробиотических препаратов на основе лактобактерий является перспективным направлением для улучшения качества лечения заболеваний слизистой оболочки полости рта.

Цель исследования - изучение биологических свойств *Lactobacillus* spp., выделенных из пародонтальных карманов у пациентов с диагнозом хронический генерализованный пародонтит лёгкой и средней степени тяжести.

**Материал и методы. Выделение и идентификация *Lactobacillus* spp.** Обследованы 45 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степени тяжести в возрасте от 35 до 60 лет, обратившихся за консультативной помощью в стоматологическую клинику «Примадент» (г. Уфа), за период с 2022 по 2023 год. Протокол исследования утверждён локальным этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета Минздрава РФ.

Критерии включения пациентов в исследование:

наличие клинических проявлений хронического генерализованного пародонтита, позволяющих поставить диагноз хронический генерализованный пародонтит лёгкой или средней степени тяжести;

наличие информированного согласия пациента на участие в исследовании.

Критерии исключения пациентов:

несоблюдение протокола исследования, отказ пациента от проведения исследования.

Критерии невключения:

отсутствие клинических проявлений хронического генерализованного пародонтита, позволяющих поставить диагноз хронический генерализованный пародонтит лёгкой или средней степени тяжести;

наличие соматической патологии в стадии декомпенсации;

наличие онкологических заболеваний;

прием за 1 месяц до исследования антибиотиков, гормональных препаратов, цитостатиков;

беременность, кормление грудью.

Взятие содержимого пародонтальных карманов производилось при помощи стерильных бумажных штифтов Absorbent Paper Points (META BIOMED, Южная Корея) (размер № 25 по ISO). Стерильным пинце-

том штифт вводился в наиболее глубокие участки пародонтальных карманов на 15 секунд, затем немедленно помещался в стерильные пробирки типа Eppendorf 1,5 мл объёма с тиогликолевой средой. Транспортировка биологического материала в бактериологическую лабораторию осуществлялась в термоконтейнере. Исследуемый материал из различных разведений засеивали на агаризованную МРС питательную среду (*Lactobacillus* MRS agar) (HiMedia, Индия) на 48 часов, инкубировали при температуре 37 °С. Состав питательной среды МРС, г/л: пептон - 10,0; дрожжевой экстракт - 20,0; глюкоза - 20,0; твин-80 - 1,0; дикалиягидрофосфат - 2,0; натрия ацетат - 5,0; триаммония цитрат - 2,0; магния сульфат - 0,2; марганца сульфат ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ) - 0,05; мясная вода - до 1 л; pH 6,2 [22]. В ходе исследования выделено 9 штаммов лактобактерий, представленных двумя морфологическими типами.

Идентификацию до рода и вида проводили по культуральным, морфологическим и тинкториальным, ферментативным, антигенным свойствам и с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии на приборе масс-спектрометре Autof MS (КНР).

**Адгезия *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию.** Адгезию выделенных штаммов определяли на буккальном эпителии. Для этого делали соскоб стерильным деревянным шпателем с внутренней поверхности щеки человека. Дальнейшие манипуляции осуществляли по методике А.Г. Бойцова и соавт. [23]. В пробирки вносили 800 мкл суспензии эпителиальных клеток и 600 мкл суспензии выделенных штаммов лактобактерий. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37 °С, периодически перемешивали переворачиванием пробирок. После инкубации неадсорбированные клетки бактерий убирали путём двукратного отмывания и центрифугирования (1000 об./мин в течение 3-х минут). Из полученного осадка готовили мазки, которые после фиксации окрашивали генциановым фиолетовым. При микроскопии препарата подсчитывали количество клеток бактерий, прикрепившихся к поверхности каждой эпителиальной клетки. Подсчёт проводили не менее чем у 5-ти клеток эпителиоцитов и определяли индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ) по среднему числу адгезировавшихся микроорганизмов. Микроорганизмы считали неадгезивными при  $ИАМ \leq 10,5$ ; низкоадгезивными - от 10,51 до 20,5; имели среднюю степень адгезии при ИАМ от 20,51-39,5, высокоадгезивными - при  $ИАМ \geq 40$  и больше [23].

**Антагонизм штаммов *Lactobacillus* spp. к УПМ.** Антагонистическую активность лактобактерий определяли диффузионным методом (метод перпендикулярных штрихов), когда происходит диффузия антибиотических веществ, образуемых изолированными штаммами лактобактерий в толщу агаровой питательной среды, содержащую тест-культуру микроорганизмов и подавляющую её рост. На питательную среду засеивали выделенные культуры *Lactobacillus* spp. и инкубировали при 37 °С 24 часа для образования и диффузии в агар ингибиторных соединений. Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры лактобактерий, не касаясь в зоне 1 мм штриха, подсеивали тест-штаммы *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC и *Staphylococcus aureus* 206 ATCC (USA) из коллекции ФГБОУ



ВО БГМУ Минздрава России. Чашку инкубировали в условиях, благоприятных для роста тест-культуры. Наличие и степень антагонистической активности у выделенных штаммов лактобактерий определяли по величине зоны ингибирования роста тест-штамма на границе со штрихом роста лактобактерии.

**Анализ биоплёнок, формируемых на инертных поверхностях.** Способность выделенных штаммов лактобацилл к биоплёнкообразованию изучали в лунках полистиролового 48-луночного планшета («SARSTEDT», Германия). Суспензии суточных культур *Lactobacillus* spp., выращенные на питательной среде MRS, довели до титра  $10^7$  КОЕ/мл. В лунки планшета вносили по 300 мкл полученной разведённой бактериальной суспензии. Планшет накрывали крышкой, заворачивали плёнкой Parafilm («Amcor», США) и инкубировали 3 суток, 1 неделю, 2 недели при 37 °С. После культивирования из лунок удаляли среду с планктонными клетками. Биопленки промывали 1 М фосфатносолевым буфером (PBS, pH 6.5). Для количественного определения интенсивности образования биоплёнок окрашивали 5 мин 0.1% раствором генциан фиолетового (кристаллический фиолетовый) («Агат-Мед», Россия) и осторожно промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в этаноле и измеряли оптическую плотность при длине волны 590 нм [24]. Результаты учитывали спектрофотометрически с использованием прибора EnspireModel 2300 Multilabel Microplate Reader («PerkinElmer», США) [25].

**Статистический анализ.** На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из  $n$ -числа повторностей (где  $n \geq 10$ ) и их стандартные отклонения. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использован параметрический критерий Стьюдента, значения  $t$ -критерия находили для 95% уровня значимости. Данные в таблицах и на рисунках представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, количество повторений указано для каждого случая отдельно. Результаты обработаны с использованием стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2010.

**Результаты. Идентификация выделенных штаммов *Lactobacillus* spp.** Выделенные штаммы лактобактерий при микроскопии представлены двумя морфологическими формами: одна (клинические изоляты 1, 4, 6, 7) представлена прямыми полиморфными короткими палочками, располагающимися в мазках преимущественно в скоплениях неправильной формы; другая (клинические изоляты 2, 3, 5, 8, 9) – длинными прямыми палочками, располагающимися в мазках одиночно, парами или с тенденцией к образованию коротких цепочек. По Граму окрашивались положительно. Культуры не образовывали спор и капсул, каталазоотрицательные, не восстанавливающие нитратов.

При росте на MRS-среде исследуемые изоляты первого морфологического типа формировали мелкие желтоватые звёздчатые плоские колонии диаметром до 5 мм, второго – слегка выпуклые непрозрачные колонии молочного цвета с глянцевой гладкой поверхностью и ровным краем, диаметром 2-3 мм (рис. 1).

При изучении биохимических свойств установлено, что клинические изоляты первого морфологического

типа характеризовались способностью к ферментации ряда углеводов и спиртов с образованием газа: D-рибозы, D-галактозы, D-глюкозы, D-фруктозы, D-маннозы, D-мальтозы, D-сахарозы, N-ацетилглюкозамина, но не D-маннита, D-сорбитола, эскулина. Клинические изоляты второго морфологического типа ферментировали без образования газа D-рибозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, D-маннит, D-сорбитол, D-мальтозу, D-сахарозу, D-лактозу, эскулин.

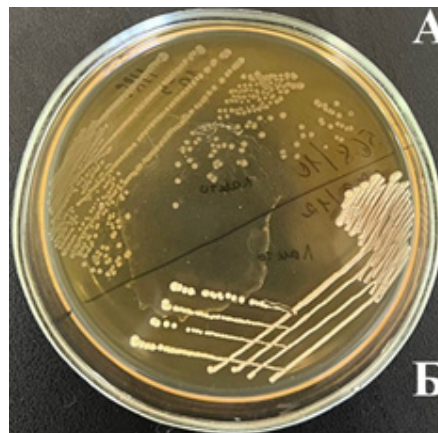


Рис. 1. Колонии клинических изолятов молочнокислых бактерий на питательной среде MRS: А – колонии изолятов первого морфологического типа; Б – колонии изолятов второго морфологического типа.

На основании морфологических, культуральных и биохимических свойств клинические изоляты первого морфологического типа (1, 4, 6, 7) отнесены к виду *Lactobacillus fermentum*, второго (2, 3, 5, 8, 9) – к *Lactobacillus casei*.

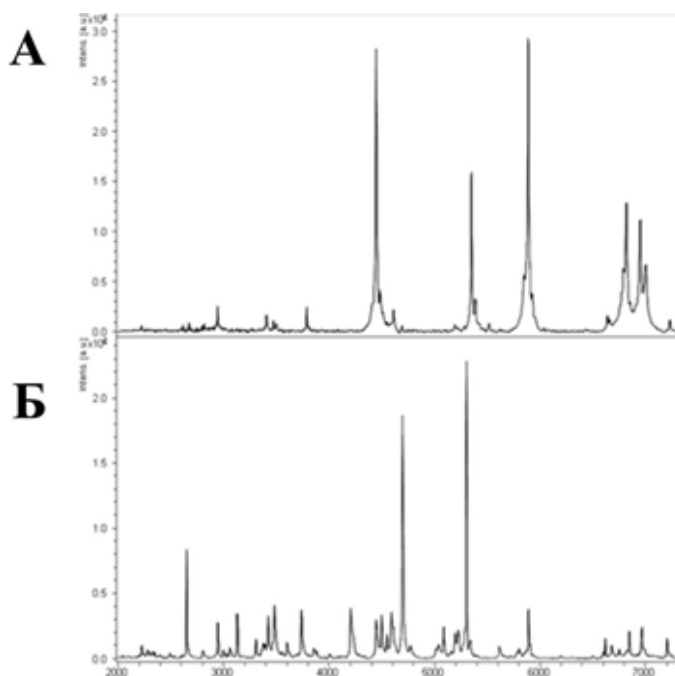


Рис. 2. Масс-спектры чистых культур *Lactobacillus* spp. А – *L. fermentum*; Б – *L. casei*.

Для окончательной идентификации клинических изолятов использован метод MALDI-ToF MS. Установлено, что клинические изоляты, образующие звездчатые колонии сероватого цвета, относятся к виду *L. fermentum*, а белые блестящие слегка выпуклые колонии – к *L. casei* (рис. 2). Установлено, что 44,4%

от всех клинических изолятов лактобацилл составили штаммы *L. fermentum*, 66,6% – *L. casei*.

**Адгезивная способность штаммов *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию.** Все выделенные штаммы *Lactobacillus* spp. способны адгезироваться на поверхности эпителиоцитов (табл. 1).

Таблица 1

Индекс адгезии клинических изолятов лактобацилл к буккальному эпителию ( $p < 0.05$ )

Категория микроорганизмов по степени адгезии	Индекс адгезии микроорганизмов (ИАМ)	Клинические изоляты
Низкоадгезивные	1,9±0,01	<i>L. casei</i> 9
	2,14±0,02	<i>L. fermentum</i> 6
	2,31±0,04	<i>L. casei</i> 8
Среднеадгезивные	13,52±0,1	<i>L. casei</i> 5
	13,7±0,08	<i>L. fermentum</i> 4
Высокоадгезивные	44,13±0,02	<i>L. casei</i> 3
	54,4±0,18	<i>L. casei</i> 2
	44,6±0,16	<i>L. fermentum</i> 1
	65,18±0,03	<i>L. fermentum</i> 7

Значения индекса адгезии микроорганизмов позволили разделить все исследуемые культуры на 3 категории. К категории низкоадгезивных отнесены три штамма бактерий: *L. casei* 9, *L. fermentum* 6, *L. casei* 8. Среднеадгезивными оказались всего два штамма (22,3% от общего количества выделенных культур): *L. casei* 5, *L. fermentum* 4. Высокой степенью адгезии характеризовались 4 штамма: *L. casei* 3 и 2, *L. fermentum* 1 и 7. Количество культур

микроорганизмов внутри этой группы наибольшее, что в процентном отношении составило 44,4%.

**Антагонистические свойства штаммов *Lactobacillus* spp.** Антагонистические свойства клинических изолятов лактобацилл определяли в отношении тест-культур *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Значения зон задержки роста индикаторных УПМ приведены в табл. 2.

Таблица 2

Антагонизм клинических изолятов лактобацилл в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* ( $p < 0.05$ )

Штаммы <i>Lactobacillus</i> spp.	Диаметр зон задержки роста индикаторных УПМ, мм	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. fermentum</i> 1	19±2	22±2
<i>L. fermentum</i> 4	21±1	18±2
<i>L. fermentum</i> 6	23±1	21±3
<i>L. fermentum</i> 7	29±2	25±3
<i>L. casei</i> 2	22±1	21±2
<i>L. casei</i> 3	23±4	19±2
<i>L. casei</i> 5	20±1	20±2
<i>L. casei</i> 8	20±4	22±1
<i>L. casei</i> 9	19±3	19±1

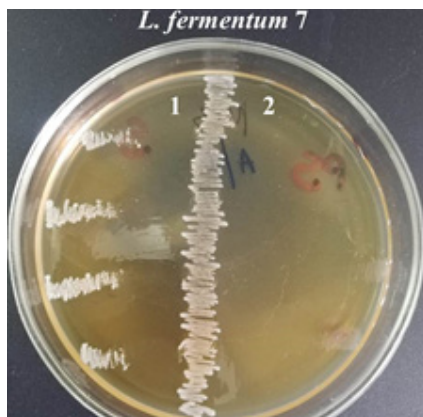


Рис. 3. Антагонизм *Lactobacillus* 7 к тест-штаммам: 1 – по отношению к *S. aureus*; 2 – к *P. aeruginosa*.

Из всех тестируемых штаммов лактобацилл наибольшую активность в отношении тест-штаммов проявила *L. fermentum* 7. Данный штамм хорошо ингибировал рост *S. aureus* и практически полностью подавлял *P. aeruginosa* (рис. 3).

**Способность штаммов *Lactobacillus* spp. к биоплёнкообразованию.** При исследовании способности к биоплёнкообразованию у выделенных штаммов лактобацилл установлено, что клинические изоляты значительно отличались как по динамике изменений, так и по самим значениям относительной оптической плотности сформированных биоплёнок на протяжении трёх периодов культивирования: 3, 7, 14 суток (рис. 4).

**Обсуждение.** Известно, что *Lactobacillus* spp. с высокой адгезивной способностью выживают в стрессовых условиях полости рта, способны формировать

агрегаты, микроколонии, биоплёнки на поверхностях слизистой оболочки полости рта. *Lactobacillus* spp. с высокой адгезивной способностью могут ингибировать активность патогенных бактерий, уменьшать взаимодействие между патогенными бактериями и слизистой оболочкой полости рта, конкурируя за рецепторы

для адгезии эпителиальных клеток, и ингибировать образование биоплёнок патогенными бактериями [26-29]. Исследование выявило 4 высокоадгезивных штамма *L. casei* 3 и 2, *L. fermentum* 1 и 7, что составило 44,4% культур микроорганизмов из выделенных нами штаммов *Lactobacillus* spp.

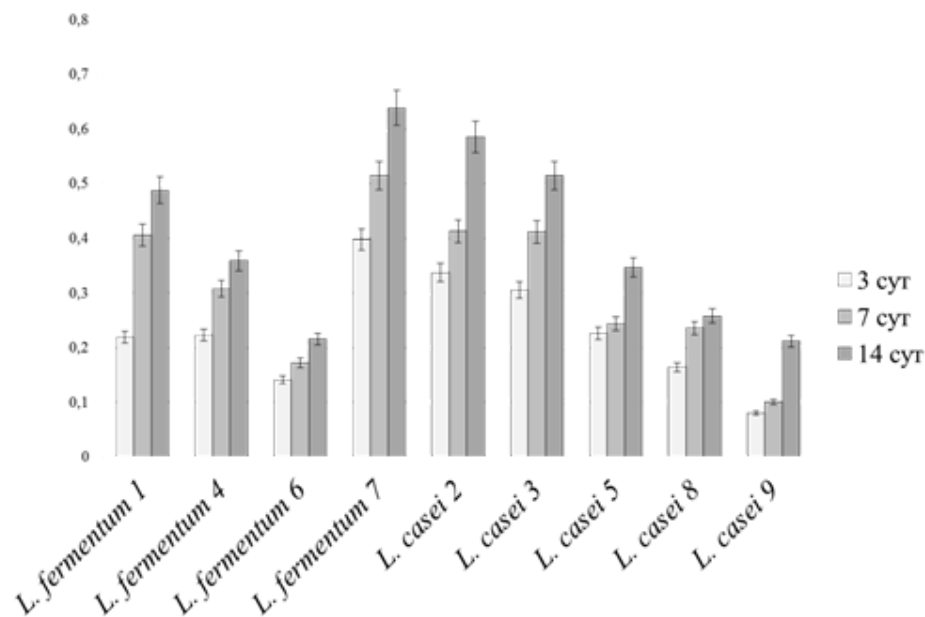


Рис. 4. Относительная биомасса биоплёнок *Lactobacillus* spp. в трёх периодах времени.

\* - средние значения трех повторов экспериментов.

Лактобактерии после успешного прикрепления и колонизации слизистой оболочки полости рта должны обладать способностью ингибировать прикрепление и размножение патогенных бактерий и УПМ. Основными механизмами воздействия *Lactobacillus* spp. на патогены являются выработка ингибирующих веществ, препятствование адгезии патогенных бактерий, модуляция иммунной системы человека, улучшение барьерной функции организма. Антагонистические свойства лактобактерий обусловлены не только продукцией органических кислот (молочной, уксусной), но также молекулами пероксида водорода и образованием бактериоцинов, схожих по своему действию с антибиотиками. Бактериоцины, угнетая рост и развитие УПМ, препятствуют колонизации ими слизистой оболочки полости рта [30]. Все отобранные штаммы *Lactobacillus* spp. частично ингибируют рост *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Наибольшую активность в отношении индикаторных тест-штаммов проявила *L. fermentum* 7, а другие штаммы имели низкие показатели антагонистической активности. Необходимо отметить, что более чем 50% клинических изолятов лактобацилл не проявляли высокой степени антагонизма в отношении тест-культур УПМ. Большинство клинических штаммов лактобактерий, выделенных от пациентов с пародонтитом, характеризуются недостаточным уровнем синтеза противомикробных веществ, о чём свидетельствует средняя и низкая степени антагонизма в отношении тест-штаммов УПМ, кроме *L. fermentum* 7. Этим можно объяснить

и то, что при пародонтите штаммы *Lactobacillus* spp. выделяются от пациентов в очень низких титрах, в отличие от УПМ, титры которых при данной патологии высоки. *L. fermentum* 7 проявила высокую антагонистическую активность, что имеет важное значение для разрушения или уменьшения сформировавшихся биоплёнок патогенных бактерий. Штаммы *L. rhamnosus* и *L. plantarum* способны расти в искусственной среде мокроты, имитирующей микроокружение лёгких при муковисцидозе, и ингибировать рост планктонных клеток и биоплёнок клинических штаммов *P. aeruginosa*, ассоциированных с данным заболеванием [31].

Наряду со способностью к адгезии культур микроорганизмов важное значение имеет биоплёнкообразование, способствующее размножению и выживанию культур бактерий в неблагоприятных условиях. Эта способность *Lactobacillus* spp., входящих в состав нормальной микробиоты полости рта человека, свидетельствует о формировании симбиотического микробного консорциума, угнетающего развитие патогенов за счёт усиления синтеза веществ, обладающих антагонистическим действием. Установлено, что наилучшей биоплёнкообразующей способностью характеризовался штамм *L. fermentum* 7. Высокие показатели биоплёнкообразования отмечены у клинических изолятов *L. casei* 2, *L. casei* 3, *L. fermentum* 1. Слабой способностью к формированию биоплёнок характеризовались штаммы *L. fermentum* 6 и *L. casei* 9.

Клинические изоляты лактобацилл имели высокую



способность к биопленкообразованию, а именно: *L. fermentum* 1, *L. fermentum* 7, *L. casei* 3 и *L. casei* 2, и одновременно характеризовались высокой адгезивной способностью к клеткам буккального эпителия. Такие результаты, возможно, связаны с недавним или систематическим применением антисептических и антибиотических средств пациентами на момент проведения исследования. Прочие клинические изоляты обладали средней способностью к формированию биопленки.

**Заключение.** Лекарственные формы пробиотиков для полости рта на основе штаммов лактобактерий могут стать эффективным дополнительным средством профилактики и лечения пациентов с заболеваниями пародонта. Ряд изученных клинических изолятов *Lactobacillus* spp. обладают высокой адгезивной способностью, средней антагонистической активностью и могут быть определены на роль кандидатов для дальнейших исследований и создания на их основе новых оральных пробиотиков для восстановления микроэкологии полости рта при дисбиозах. Особое внимание при дальнейших исследованиях следует обратить на штамм *L. fermentum* 7.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Devine D.A., Marsh P.D., Meade J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *J. Oral. Microbiol.* 2015; 7: 26941. DOI: 10.3402/jom.v7.26941.
- Хабибуллина А.Р., Тимофеева А.В. Микробиом дентальной бляшки человека. *Современные проблемы науки и образования.* 2017; 3: 155.
- Царёв В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии – основной фактор возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2017; 5: 101-12. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-101-12.
- Ruan Q., Guan P., Qi W., Li J., Xi M. et al. *Porphyromonas gingivalis* regulates atherosclerosis through an immune pathway. *Front Immunol.* 2023; 14:1103592. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1103592.
- Гимранова И.А., Хакимова Л.Р., Акмалова Г.М., Газизуллина Г.Р. Современные методы диагностики заболеваний пародонта: возможности и перспективы (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2023; 68(9): 570-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-9-570-577.
- Lamont R.J., Koo H., Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018; 16:745-59. DOI: 10.1038/s41579-018-0089-x
- Kolenbrander P.E., Palmer R.J.Jr., Periasamy S., Jakubovics N.S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8: 471-80. DOI: 10.1038/nrmicro2381.
- Shi B., Chang M., Martin J., Mitreva M., Lux R., Klokkevold P. et al. Dynamic changes in the subgingival microbiome and their potential for diagnosis and prognosis of periodontitis. *mBio.* 2015; 6(1):e01926-14. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01926-14>.
- Laleman I., Teughels W. Probiotics in the dental practice: a review. *Quintessence Int.* 2015; 46(3): 255-64. DOI: 10.3290/j.qi.a33182
- Джафаров Э.М., Эдишерашвили У.Б., Долгалев А.А., Гаража С.Н., Шульга Г.С. Перспективы применения пробиотиков при лечении заболеваний пародонта. Обзор литературы. *Главный врач Юга России.* 2022; 3 (84): 25-30.
- Inchingolo F., Inchingolo A.M., Malcangi G., De Leonardis N., Sardano R., Pezzolla C. et al. The benefits of probiotics on oral health: systematic review of the literature. *Pharmaceuticals.* 2023; 16(9): 1313. DOI: 10.3390/ph16091313.
- Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. 3-е изд. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
- Биктимерова О.О., Рединова Т.Л., Зорин А.Ю. Изменение клинических и иммунологических показателей полости рта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при лечении пробиотиками. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2014; 3 (57): 34-6.
- Di Cosola M., Cazzolla A.P., Charitos I.A., Ballini A., Inchingolo F., Santacroce L. *Candida albicans* and oral carcinogenesis. A brief review. *Journal of Fungi.* 2021;7(6): 476. DOI: 10.3390/jof7060476.
- Vazquez-Munoz R., Thompson A., Sobue T., Dongari-Bagtzoglou A. A prebiotic diet modulates the oral microbiome composition and results in the attenuation of oropharyngeal candidiasis in mice. *Microbiol. Spectr.* 2023; e0173423. DOI: 10.1128/spectrum.01734-23.
- Sarmento É.G., Cesar D.E., Martins M.L., de Oliveira Góis E.G., Furtado Martins E.M., da Rocha Campos A.N. et al. Effect of probiotic bacteria in composition of children's saliva. *Food Res. Int.* 2019; 116:1282-8. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.10.017.
- Inchingolo F., Martelli F.S., Gargiulo Isacco C., Borsani E., Cantore S., Corcioli F. et al. chronic periodontitis and immunity, towards the implementation of a personalized medicine: a translational research on sene single nucleotide polymorphisms (SNPs) linked to chronic oral dysbiosis in 96 caucasian patients. *Biomedicines.* 2020; 8:115. DOI: 10.3390/biomedicines8050115.
- Invernici M.M., Furlaneto F.A.C., Salvador S.L., Ouwehand A.C., Salminen S., Mantziari A. et al. Bifidobacterium animalis subsp Lactis HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *PLoS One.* 2020; 15: e0238425. DOI: 10.1371/journal.pone.0238425.
- Janiani P., Ravindran V. Comparative evaluation of the antimicrobial effects of probiotic milk and probiotic powder on the salivary *Streptococcus mutans* counts and the plaque scores in children aged 3-6 years: A randomized controlled trial. *Dent. Med. Probl.* 2022; 59(1):99-104. DOI: 10.17219/dmp/139731.
- Lee D.-S., Kim M., Nam S.-H., Kang M.-S., Lee S.-A. Effects of Oral Probiotics on subjective halitosis, oral health, and psychosocial health of college students: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021; 18: 1143. DOI: 10.3390/ijerph18031143.
- Staszczuk M., Jamka-Kasprzyk M., Kościelniak D., Cienkosz-Stepańczyk B., Krzyściak W., Jurczak A. Effect of a short-term intervention with *Lactobacillus salivarius* probiotic on early childhood caries-an open label randomized controlled trial. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022; 19: 12447. DOI: 10.3390/ijerph191912447.
- Хакимова Л.Р., Потапова С.М., Ахметова Л.Р., Гимранова И.А. Изучение биологических свойств аутоштаммов *Lactobacillus* spp. для создания пробиотиков. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2023; 68 (8): 480-8. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-8-480-488.
- Бойцов А.Г., Ришук С.В., Ильясов Ю.Ю., Гречанинова Т.А. Адгезия лактобактерий к клеткам вагинального и буккального эпителия. *Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии им. И.И. Мечникова.* 2004; 4 (5):191-3.
- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998; 28: 449-61.
- Вершинина З. Р., Чубукова О. В., Никоноров Ю. М., Хакимова Л. Р., Лавина А. М., Каримова Л. Р. и др. Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum*. *Микробиология.* 2021; 90(2):191-203. DOI: 10.31857/S0026365621020154.
- Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A. et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018; 81: 7-11. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- Vasiee A., Falah F., Mortazavi S.A. Evaluation of probiotic potential of autochthonous lactobacilli strains isolated from zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. *J. Appl. Microbiol.* 2022; 133: 3201-14. DOI: 10.1111/jam.15772.
- Barzegari A., Kheyrolahzadeh K., Khatibi S.M.H., Sharifi S., Memar M.Y., Vahed S.Z. The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infect. Drug. Resistance.* 2020; 13: 659-72. DOI: 10.2147/IDR.S232982.
- Gou H.-Z., Zhang Y.-L., Ren L.-F., Li Z.-J., Zhang L. How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Front. Microbiol.* 2022; 13: 929346. DOI: 10.3389/fmicb.2022.929346.
- Mathipa M.G., Thantsha M.S. Probiotic engineering: towards devel-

- opment of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut. Pathog.* 2017; 9: 28. DOI: 10.1186/s13099-017-0178-9.
31. Batoni G., Catelli E., Kaya E., Pompilio A., Bianchi M., Ghelardi E. et al. Antibacterial and antibiofilm effects of lactobacilli strains against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to cystic fibrosis. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12(7):1158. DOI: 10.3390/antibiotics12071158.
- 
- ## REFERENCES
- Devine D.A., Marsh P.D., Meade J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *J. Oral Microbiol.* 2015; 7: 26941. DOI 10.3402/jom.v7.26941.
  - Khabibullina A.R., Timofeeva A.V. Microbiome of human dental plaque. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; 3: 155. (in Russian)
  - Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria are the main factor in the occurrence and development of periodontitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 5: 101-12. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-101-112. (in Russian)
  - Ruan Q., Guan P., Qi W., Li J., Xi M. et al. *Porphyrromonas gingivalis* regulates atherosclerosis through an immune pathway. *Front Immunol.* 2023; 14:1103592. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1103592.
  - Gimranova I.A., Khakimova L.R., Akmalova G.M., Gazizullina G.R. Modern methods of diagnosis of periodontal diseases: opportunities and prospects (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68(9): 570-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-9-570-577. (in Russian)
  - Lamont R.J., Koo H., Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018; 16:745-59. DOI: 10.1038/s41579-018-0089-x.
  - Kolenbrander P.E., Palmer R.J., Periasamy S., Jakubovics N.S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8:471-80. DOI: 10.1038/nrmicro2381.
  - Shi B., Chang M., Martin J., Mitreva M., Lux R., Klokkevold P. et al. Dynamic changes in the subgingival microbiome and their potential for diagnosis and prognosis of periodontitis. *mBio*. 2015; 6(1):e01926-14. DOI: 10.1128/mBio.01926-14.
  - Laleman I., Teughels W. Probiotics in the dental practice: a review. *Quintessence Int.* 2015; 46(3): 255-64. DOI: 10.3290/j.qi.a33182.
  - Dzafarov E.M., Edisherashvili U.B., Dolgalev A.A., Garazha S.N., Shulga G.S. Prospects for the use of probiotics in the treatment of periodontal diseases. Literature review. *Glavnyi vrach Yuga Rossii*. 2022; 3 (84): 25-30. (in Russian)
  - Inchingolo F., Inchingolo A.M., Malcangi G., De Leonardis N., Sardano R., Pezzolla C. et al. The Benefits of probiotics on oral health: systematic review of the literature. *Pharmaceuticals*. 2023; 16(9):1313. DOI: 10.3390/ph16091313.
  - Vorob'yov A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N. Medical microbiology, virology and immunology: Textbook for medical students. [Meditinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: Uchebnik dlya studentov meditsinskikh vuzov]. 3<sup>rd</sup> ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoye agentstvo; 2022. (in Russian)
  - Biktimerova O.O., Redinova T.L., Zorin A.Yu. Changes in clinical and immunological parameters of the oral cavity in patients with chronic generalized periodontitis during treatment with probiotics. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 57 (3): 34-6. (in Russian)
  - Di Cosola M., Cazzolla A.P., Charitos I.A., Ballini A., Inchingolo F., Santacroce L. *Candida albicans* and oral carcinogenesis. A brief review. *Journal of Fungi*. 2021; 7(6): 476. DOI: 10.3390/jof7060476.
  - Vazquez-Munoz R., Thompson A., Sobue T., Dongari-Bagtzoglou A. A prebiotic diet modulates the oral microbiome composition and results in the attenuation of oropharyngeal candidiasis in mice. *Microbiol. Spectr.* 2023:e0173423. DOI: 10.1128/spectrum.01734-23.
  - Sarmiento E.G., Cesar D.E., Martins M.L., de Oliveira Góis E.G., Furtado Martins E.M., da Rocha Campos A.N. et al. Effect of probiotic bacteria in composition of children's saliva. *Food Res. Int.* 2019; 116:1282-8. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.10.017.
  - Inchingolo F., Martelli F.S., Gargiulo Isacco C., Borsani E., Cantore S., Corcioli F. et al. Chronic periodontitis and immunity, towards the implementation of a personalized medicine: a translational research on gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) linked to chronic oral dysbiosis in 96 caucasian patients. *Biomedicines*. 2020; 8:115. DOI: 10.3390/biomedicines8050115.
  - Invernici M.M., Furlaneto F.A.C., Salvador S.L., Ouwehand A.C., Salminen S., Mantziari A. et al. Bifidobacterium animalis subsp lactis HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *PLoS One*. 2020; 15: e0238425. DOI: 10.1371/journal.pone.0238425.
  - Janiani P., Ravindran V. Comparative evaluation of the antimicrobial effects of probiotic milk and probiotic powder on the salivary *Streptococcus mutans* counts and the plaque scores in children aged 3-6 years: A randomized controlled trial. *Dent. Med. Probl.* 2022; 59(1): 99-104. DOI: 10.17219/dmp/139731.
  - Lee D.-S., Kim M., Nam S.-H., Kang M.-S., Lee S.-A. Effects of oral probiotics on subjective halitosis, oral health, and psychosocial health of college students: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021; 18: 1143. DOI: 10.3390/ijerph18031143.
  - Staszczuk M., Jamka-Kasprzyk M., Kościelniak D., Cienkosz-Stepańczyk B., Krzyściak W., Jurczak A. Effect of a short-term intervention with *Lactobacillus salivarius* probiotic on early childhood caries—an open label randomized controlled trial. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022; 19: 12447. DOI: 10.3390/ijerph191912447.
  - Khakimova L.R., Potapova S.M., Akhmetova L.R., Gimranova I.A. Study of biological properties of *Lactobacillus* spp. to create probiotics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (8): 480-8. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-8-480-488. (in Russian)
  - Boytsov A.G., Rishchuk S.V., Il'yasov Yu.Yu., Grechaninova T.A. Adhesion of lactobacilli to vaginal and buccal epithelial cells. *Vestnik Sankt-Peterburgskoy meditsinskoy akademii im. I.I. Mechnikova*. 2004; 4 (5):191-3. (in Russian)
  - O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28: 449-61.
  - Vershina Z.R., Chubukova O.V., Nikonov Y.M., Khakimova L.R., Lavina A.M., Karimova L.R. et al. Effect of rosR gene overexpression on biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mikrobiologiya*. 2021; 90(2): 198-209. DOI: 10.31857/S0026365621020154. (in Russian)
  - Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A. et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018; 81: 7-11. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
  - Vasiee A., Falah F., Mortazavi S.A. Evaluation of probiotic potential of autochthonous lactobacilli strains isolated from zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. *J. Appl. Microbiol.* 2022; 133: 3201-14. DOI: 10.1111/jam.15772.
  - Barzegari A., Kheyrolahzadeh K., Khatibi S.M.H., Sharifi S., Memar M.Y., Vahed S.Z. The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infect. Drug. Resistance*. 2020; 13: 659-72. DOI: 10.2147/IDR.S232982.
  - Gou H.-Z., Zhang Y.-L., Ren L.-F., Li Z.-J., Zhang L. How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Front. Microbiol.* 2022; 13: 929346. DOI: 10.3389/fmicb.2022.929346.
  - Mathipa M.G., Thantsha M.S. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut. Pathog.* 2017; 9: 28. DOI: 10.1186/s13099-017-0178-9.
  - Batoni G., Catelli E., Kaya E., Pompilio A., Bianchi M., Ghelardi E. et al. Antibacterial and antibiofilm effects of Lactobacilli strains against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to cystic fibrosis. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12(7):1158. DOI: 10.3390/antibiotics12071158.