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

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Амирханова Элена Эдуардовна

Формирование биопленок штаммами *Pseudomonas* на биологических объектах (корнях растений)

Научный руководитель:

профессор, д.б.н. Баймиев А.Х.

Уфа-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR)

1.2 Микробные биопленки как способ сохранения микроорганизмов

1.3 Пути преодоления формирования микробных биопленок

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

2.2 Оборудование

2.3 Приготовление электрокомпетентных клеток *Pseudomonas*

2.4 Электропорация компетентных клеток *Pseudomonas* (для получения флуоресцентных штаммов)

2.5 Микроскопирование корней растений

2.6 Исследование влияния *Pseudomonas* на ростовые параметры растений

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение ростостимулирующей активности штаммов *Pseudomonas sp. 102, Pseudomonas sp. 103* по отношению к растениям томата *(Solanum lycopersicum L.)* и рапса *(Brassica napus).*

3.2 Получение маркированных флуоресцентными белками штаммов для их детекции.

3.3 Анализ биопленок, образуемых штаммами на корнях растений-макросимбионтов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЫВОДЫ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Бактерии рода *Pseudomonas* – одна из наиболее изученных и обладающих полезными для растения свойствами групп микроорганизмов, Исследования последнего десятилетия показали, что большинство бактерий (более 99 %), в том числе и *Pseudomonas,* существуют в природных экосистемах в виде специфически организованных прикрепленных к субстратам биопленок, образование которых представляет сложный, строго регулируемый биологический процесс.

Биопленка является живым, постоянно обновляющимся сообществом одного или нескольких видов бактерий, закрепившихся на биогенном или абиогенном субстратах и окруженных полимерным матриксом, который предохраняет их от вредных воздействий окружающей среды и служит одним из факторов межклеточного общения.

В качестве объектов исследования в данной работе будут использованы условно-патогенные штаммы псведомонад, обладающие свойствами PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Данные бактерии способны колонизировать корни растений и способствовать повышению урожайности за счет различных механизмов. Полученные данные по изучению условий биопленкообразования могут быть полезны в плане расширения перспективы их использования в сельскохозяйственной практике, а также в дальнейших исследованиях, связанных с подавлением активности патогенных штаммов псевдомонад.

Цель: Исследование формирования биопленок штаммами *Pseudomonas* на поверхностях корней томата (*Solanum lycopersicum L.*) и рапса (*Brassica napus*).

Задачи:

1. Определение ростостимулирующей активности штаммов *Pseudomonas sp. 102*, *Pseudomonas sp. 103* по отношению к растениям томата (*Solanum lycopersicum L.*) и рапса (*Brassica napus*).

2. Получение маркированных флуоресцентными белками штаммов для их детекции.

3. Анализ биопленок, образуемых штаммами на корнях растений-макросимбионтов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR)

Ризобактерии – это большая группа бактерий, которые способствуют улучшению роста и развития растений. Зоны, которые непосредственно примыкают к корням живых растений, называют областями активного развития микроорганизмов

Ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR), группа корневых бактерий, которые тесно взаимодействуют с корнями растений и следовательно, влияют на здоровье растений и почву. Ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR), были впервые определены Клоппером и Шротом (1978) как почвенные бактерии, которые колонизируют корни растений. Среди PGPR, флуоресцентные псевдомонады, стали самой большой и потенциально наиболее многообещающей группой PGPR с их быстрым ростом, простыми потребностями в питании, способностью использовать разнообразные органические субстраты и мобильность. Флуоресцентные псевдомонады производят мощные противогрибковые молекулы широкого спектра против различных фитопатогенов, таким образом действуя как эффективные агенты биоконтроля.

Виды *Pseudomonas* являются всеобщими бактериями в сельскохозяйственных почвах и обладают многими характеристиками, которые делают их хорошо подходящими для использования в качестве PGPR. Флуоресцентные псевдомонады представляют собой грамотрицательные аэробные палочки, подвижные с полярными жгутиками и имеющими способность производить водорастворимый желто-зеленый пигмент [43] Они включают виды *P. fluorescens (*четыре биотипа), *P. putida* (два биотипа), *P. aeruginosa, P. chlororaphis, P. aureofaciens* и *P. syringe* [52] Они, имеют высокую скорость роста в ризоплане и могут использовать большое количество органических субстратов [54], включая корневые

экссудаты [49]. Мировой интерес к этой группе ризобактерий был вызван исследованиями, начатыми в Калифорнийском университете в Беркли, США, в 1970-х годах. Флуоресцентные псевдомонады демонстрируют различные механизмы биоконтроля, которые включают антибиотики, выработку HCN, выработку сидерофоров, конкуренцию за пространство и питательные вещества и индуцированную системную резистентность. Известно, что PGPR индуцирует устойчивость к грибковым, бактериальным и вирусным заболеваниям. и насекомым-вредителям [9].

Решающим фактором успеха биологического контроля флуоресцентных псевдомонад является их способность колонизировать ризосферу и их стойкость в течение вегетационного периода , потому что они встречаются в естественной среде обитания ризосферы и обильно колонизируют поверхность корней. Флуоресцентные псевдомонады оказывают защитное действие на корни за счет антагонизма против фитопатогенных грибов и бактерий [18] путем подавления патогенов, принимающих различные режимы действий. Известно, что флуоресцентные псевдомонады вырабатывают вещества, способствующие росту растений , такие как ауксины, гиббереллины, цитокинины и т. д.[55].

Активность биоконтроля, опосредованный синтезом аллелохимических веществ

Ризобактерий, способствующие росту растений (PGPR), обеспечивается производством бактериальных аллелохимических веществ, включая железохелатирующие сидерофоры и антибиотики.

Сидерофоры

Сидерофоры представляют собой низкомолекулярные хелатирующие соединения трехвалентного железа, которые секретируются внеклеточно в условиях ограничения по железу и чья основная функция - поставлять железо клеткам, лишенным железа. В условиях, ограничивающих железо , способствующие росту растений ризобактерии производят низкомолекулярные соединения, называемые сидерофорами, для

конкурентного приобретения иона трехвалентного железа [65]. Сидерофоры представляют собой небольшие хелатирующие соединения железа, секретируемые микроорганизмами, такими как бактерии и грибы [40]. Сидерофоры *Pseudomonas siderophores* имеют высокое сродство к железу, и когда они хелатируют питательный микроэлемент, они делают его менее доступным для других микроорганизмов, включая возбудителей болезней растений. Этот механизм считается косвенным признаком стимулирования роста растений *Pseudomonas*. *Pseudomonas* может синтезировать сидерофоры железо-лимитирующих условиях. Известно, что такие соединения, как сидерофоры, синтезируются в основном во время фазы экспоненциального роста, которая является стадией, на которой популяции требуется больше питательных веществ для клетки [42]. Аналогичным образом, комплекс псевдобактина Fe имеет высокую константу стабильности [9], предполагая, что практически все молекулы псевдобактина, выделяемые из организма, связываются с Fe присутствующих в среде [37]. Следовательно, в микросредах, таких как ризосфера, синтез сидерофоров важен для придания преимущества в конкуренции за питательные вещества [37]. Синтез хелатирующих железо соединений, таких как сидерофоры, с помощью *Pseudomonas* является характерной особенностью некоторых изолятов из массивных или ризосферных почв. В культуральных средах со следовыми количествами железа можно наблюдать желто-зеленый ореол, который может флуоресцировать в ультрафиолетовом свете [7].Клоппер и др,(1980b) предположили, что сидерофоры могут участвовать в биоконтроле патогенов растений и стимулировать рост растений. С тех пор роль сидерофоров как хелатирующих агентов лишения почвенных патогенов железа является важным элементом для роста, без которого нарушается рост многих микроорганизмов [37]. Некоторые штаммы PGPR продуцируют сидерофоры, которые связывают Fe^{3+}, что делает его менее доступным для определенных представителей нативной микрофлоры [32]. Штаммы розобактерий, которые продуцируют сидерофор в условиях ограничения Fe которая нерастворима в

воде и, следовательно, недоступна для бактерии. Изоляты, принадлежащие к *P. fluorescens* , как сообщалось, продуцируют внеклеточные сидерофоры при выращивании в Хром азуроле S в условиях дефицита железа [56]. Мгновенный золотисто-желтый цвет является положительным тестом на продукцию сидерофоров на сукцинатной среде и среде с казаминовой кислотой (CAA) [16].

Антибиотики

Постулируется, что антибиотики играют важную роль в подавлении болезней, вызываемых ризобактериями [22]. Псевдомонады подавляют почвенные патогены, производя противогрибковые метаболиты, такие как аспиолеорин, пиррольнитрин,феназины и 2,4-ди-ацетилфлороглюцин [13]. 2,4 - диацетилфлороглюцин (DAPG) представляет собой фенольную молекулу, продуцируемую некоторыми ассоциированными с растениями флуоресцентными псевдомонадами [57]. Антибиотик в настоящее время часто рассматривается как важный механизм биологического контроля, что связано с тем, что это привлекательный механизм для изучения [24]. Бактериальные антагонисты-продуценты DAPG могут агрессивно колонизировать корни, что может еще больше способствовать их способности подавлять активность патогенов в ризосфере растения посредством конкуренции для органических питательных веществ [26]. Антимикробные соединения, вырабатываемые *Pseudomonas cepacia,* подавляют радиальный рост некоторых важных почвенных ризобактерий, такие *как F. oxysporum, Macrophomina phaseolina, Sclerotium rolfsii, R. solani и Pythium ultimum* [3]. Несколько штаммов флуоресцентной псевдомонады продуцируют противогрибковые метаболиты, а именно феназины, которые составляют большое семейство гетероциклических азотсодержащих окрашенных пигментов с широким спектром антибиотической активности [57]. *Pyrrolnitrin* (PRN) [3-хлор-4- (2'-нитро-3 '- хлорфенил) пиррол] - еще один производимый противогрибковый метаболит широкого спектра действия продуцируемый многими флуоресцентными и нефлуоресцентными

штаммами из рода *Pseudomonas.* Производное PRN на основе фенилпиррола было разработано как сельскохозяйственный фунгицид. *Pyrrolnitrin* активно сохраняется в почве в течение как минимум 30 дней, он не диффундирует легко и высвобождается только после лизиса бактериальной клетки [45]. Агент биологической борьбы, *P. fluorescens* BL915, как сообщается, содержит четыре кластера генов, участвующих в биосинтезе противогрибковой молекулы PRN из предшественника триптофана [23]. Активность широкого спектра пирролнитрина, продуцируемого видами *Pseudomonas* и *Burkholderia*, была замечена Nishida и др. (1965), были проведены испытания и дальнейшее развитие этого антибиотика в терапевтических целях противопатогенных бактерий и грибков человека. В отношении растительных патогенных грибов, *Pyrrolnitrin* показал активность в отношении широкого спектра базидиомицетов, дейтеромицетов и аскомицеты, включая несколько экономически важных патогенов, таких как *Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Verticillium dahliae* и *Sclerotinia sclerotiorum* [36].

Цианистый водород (HCN) вырабатывается многими ризобактериями и, как предполагается, играет определенную роль в биологическом контроле патогенов [14]. (1989) Vuzuard и др. представили доказательства того, что HCN был вовлечен в биологический контроль штаммом *Pseudomonas flourescens* CHA0, который стимулировал образование корневых волосков, указывающее на то, что штамм индуцировал изменение физиологической активности растений. Ramette и др.., (2003) сообщили, что HCN представляет собой антимикробное соединение широкого спектра действия, участвующее в биологическом контроле корневых заболеваний многими флуоресцентными псевдомонадами, ассоциированными с растениями. HCN ингибирует там транспорт электронов, нарушается подача энергии в клетки,что приводит к гибели организма. Он влияет на правильное функционирование ферментов и естественных рецепторов с помощью

обратимых механизмов ингибирования [11]. Также известно, что он ингибирует действие цитохромоксидаза [20].

Непрямое стимулирование роста растений через индуцированние системной резистентности.

Растения с PGPR также могут обеспечить системную устойчивость к широкому спектру патогенов растений. Заболевания грибкового, бактериального и вирусного происхождения, а в некоторых случаях даже повреждения, вызванные насекомыми и нематодами, могут быть уменьшены после применения PGPR [50].

Индуцированная системная резистентность

Индуцированная системная резистентность в широком смысле определяется как активация скрытых защитных механизмов у растений до патогенных атак. Было выдвинуто предположение, что этот механизм является работоспособным механизмом в нескольких ризобактериальных системах. Индуцированная системная резистентность связана с повышенным синтезом определенных ферментов, таких как пероксидаза [35], повышенным уровнем некоторых кислоторастворимых белков [66] и накоплением фитоалексинов в индуцированной растительной ткани [60].

Влияние PGRP на сельскохозяйственные культуры

Штамм *Pseudomonas* показал увеличение массы свежих корней и побегов и одновременное подавление вредной патогенной микрофлоры [59].Уолли и Гермида (1997) наблюдали увеличение сухой массы побегов с 16 до 48% и сухой массы корней с 82 до 137% при инокуляции флуоресцентными псевдомонадами. Gupta и др., (2002) *Pseudomonas* не образуют симбиоза, подобного тому, который образуется ризобиями с растениями, хотя они способны проникать в ткани растений и закрепляться в качестве эндофитов .Внутри растения они также играют важную роль в качестве PGPR и подавляют рост патогена различными механизмами. Благодаря конкуренции и производству антимикробных соединений PGPR может уменьшить популяции патогенов растений и вредных ризобактерий,

которые ограничивают рост растений. Некоторые из этих заболеваний также могут снижать рост растений, но чаще чистый эффект заключается в улучшении развития растений, что приводит к более энергичному росту и повышению урожайности сельскохозяйственных культур [17]. Виды флуоресцентных псевдомонад группируются в различные биовары и подгруппы на основе сходства в биохимических тестах [4] Были разработаны и использованы различные фенотипические и биохимические методы для характеристика изолятов псевдомонады. Большинство тестов, проведенных для идентификации флуоресцентных псевдомонад, были основаны на физиологических и пищевых тестах [28]. Большая часть растений связана с *Pseudomonas spp*. принадлежат к комплексу *P. fluorescens* и *P. putida*, и между ними не было четкого различия [53]. Однако эти два вида идентифицируются на основе утилизации трегалозы и разжижения желатина. В этом случае *P. fluorescens* показывает положительный результат для обоих тестов, в то время как *P. putida* показывает отрицательный ответ [27]. *P. fluorescens* B16 является ризобактерией, стимулирующей рост растений, и продуцирует пирролохинолинхинон, который является фактором, стимулирующим рост растений [10]. Берр и др.., (1978) сообщили, что штаммы *P. fluorescens* и *P. putida*, улучшают рост картофеля. Эти результаты были подтверждены и позже проиллюстрированы на примере помидоров и баклажанов [34] .Вран и Фикер(1994),зафиксировали от 4 до 30% улучшения роста растений и урожайности клубней картофеля, привитого *P.fluorescens* в полевых условиях. Введение гена *sss*, кодирующего способность к колонизации ризосферы, в штамм-колонизатор *P. fluorescens* WCS 307 продемонстрировало повышенную конкурентоспособную способность к колонизации ризосферы в корнях томатов, что привело к усилению защиты от *F. oxysporum , F.sp. radicis-lycopersici* [15]. Флуоресцентные псевдомонады в дополнение к способности способствовать стимулированию роста растений также являются хорошими агентами биоконтроля. Они стали самой большой и потенциально наиболее перспективной группой среди PGRP, участвующих

в биоконтроле заболеваний.*P. fluorescens* приспособлен к выживанию в почве и колонизации корней растений, и это относится также к конкретному случаю агентов *Biocontrol* этого вида [30]. Штаммы *Biocontrol* заметно наблюдались на поверхности корней (т.е. ризоплан) часто образует микроколонии или биопленки в бороздках между клетками эпидермиса. Некоторые штаммы также способны к эндофитной колонизации. Они эффективны в использовании семян и корневых экссудатов для роста и могут агрессивно колонизировать ризосферу. Штаммы, обладающие способностью к биоконтролю, могут составлять порядка 10% всех штаммов ризосферы, и они были выделены из очень широкого спектра почв, климатические регионы и растения-хозяева [48]. Существует несколько видов *Pseudomonas*, которые являются эффективными антагонистами грибковых патогенов и действуют как растительные ризобактерии ,штамм *Pseudomonas fluorescens*, как сообщалось, обладает антагонистическими свойствами в отношении *Rhizoctonia solani* [29].

Исследования показали, что обработка семян изолятом *P. fluorescens* 63-28 предотвратила проникновение возбудителя фузариозного увядания (*F.oxysporum f. sp. lycopersici*) в сосудистой ткани путем укрепления структур клеточной стенки и накопление фенольных веществ и хитиназ [38]. *Pseudomonas sp*. RSB29 демонстрирует значительное ингибирование грибковых патогенов, таких как *F. oxysporum f. sp.ciceri* RS1, *Macrophomina phaseolina* RSB9, *Fusarium udum* RSB19, *Fusarium solani RSB38* и *R. solani* BH49 были сообщены Сайкия и др., (2004). Исследования предполагают, что предварительное применение флуоресцентных псевдомонад усиливают клетку-хозяина, стеновые конструкции, приводящие к ограничению инвазия патогенов в растительную ткань [9]. Исследование также показало, что изоформа PO1 была заметно выражена в *P.fluorescens* ,выделены обработанные ткани Pf1 корней *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. Накопление фенолов, PAL, β-1,3-глюканаза и индукция изоформы PO1, PPO1и изоформы PPO2 и изоформы Chi2 *P.fluorescens* изолят Pf1 в тканях корня томата могли

коллективно способствовать индуцированной устойчивости растений томата к F. *oxysporum f. sp. lycopersici*. Подобно *Bacillus, Pseudomonas* также вызывает системную резистентность растений. Исследования показали сообщается, что *P. fluorescens* EP1, *P. putida* 5-48 и *P. fluorescens* могут защитить растения сахарного тростника, и томатов от таких патогенов *Colletotrichum falcatum, Ceratocystis fagacearum и F. Oxysporum* как изоляты *P.fluorescens* были получены из ризосферы, проверены на их антагонистическую активность in vitro, сформулированы и оценены на их способность контролировать увядание фузариоза и способствовать росту растений томатов в тепличных условиях. Свежие культуры *P. fluorescens* увеличили всхожесть проростков до 90% по сравнению с другими культурами в горшках [2]. Результаты показали, что при применении *P. fluorescens* в качестве биоконтрольного агента отрицательного эффекта не наблюдалось, напротив, они проявляли синергизм в стимулировании роста урожая и урожайности томатов, помимо борьбы с болезнью фузариозного увядания. Efri (1994) сообщил, что *P. fluorescens* может препятствовать развитию увядания томатов на 71,7% по сравнению с растениями без применения бактерий. В лабораторном тесте наблюдалось появление пустой зоны в чашке Петри, содержащей *F. oxysporum* и *P. fluorescens*. Снижение патогенной активности *F. oxysporum* псевдомонадами также может быть связана с детоксикацией фузаровой кислоты [25]. Фузариоз увядает путем детоксикации фильтратов культур различных видов фузариоза и инактивации ферментов из грибковых культур. Боровиц и др., (1992) сообщили, что внеклеточные протеазы штаммов *P. fluorescens* способны инактивировать гидролазы и фитотоксины фитопатогенного *Fusarium spp. P.fluorescens* были рекомендованы фермерам в качестве одной из защиты растений для борьбы с фузариозным увяданием томатов, и эта практика также была распространена на другие культуры. Asha и др., (2011).

1.2 Микробные биопленки как способ сохранения микроорганизмов

Для выживания и размножения у людей, животных и растений микроорганизмы используют различные стратегические методы, включая формирование особой структурной и функциональной организации их сообществ, называемых биопленками.

Биопленка - это высокоорганизованная мобильная непрерывность изменяющихся гетерогенных сообществ, состоящая из активности функционирующих клеток и спящих форм, заключенных в экзополимерную матрицу [116,111,123,83].Для большинства из них самым важным является бактериальное состояние биопленки, которое формировалось за миллионы лет под влиянием естественного отбора в меняющихся условиях окружающей среды.

Согласно современным представлениям, микробные биопленки состоят из трех основных компонентов:

1. Поверхность (интерфейс), на которой расположена биопленка;

2. Ряд микроорганизмов;

3. Внеклеточный матрикс, объединяющий микроорганизмы в единую систему.

Биопленки могут состоять из одного или нескольких видов микроорганизмов [116, 111].

С появлением понятия "биопленка" в теории инфекции началось качественное переосмысление как основных механизмов инфекционного процесса, так и практических подходов к терапии и профилактике патологии биопленки. Это связано с тем, что бактерии в биопленке имеют принципиальные отличия от бактерий, находящихся в планктонном (плавающем) состоянии, что может повысить патогенность бактерий биопленки, а также обеспечить развитие устойчивости к иммунным системным эффекторам и противомикробным препаратам [113,133]. Это может привести к хронизации инфекционного процесса, развитию осложнений и неэффективности антибактериальной терапии

[131,129,121,79,67,105]. Ситуация усугубляется тем, что при лабораторной оценке эффективности антимикробного воздействия в домашних условиях все исследования проводятся на чистых культурах бактерий, выращенных в богатых питательными веществами средах в планктонном видеоарте. Такие условия далеки от реальности, при которых бактерициды сохраняются в организме больных с тяжелыми септическими процессами [79].

Инфекции, патогенез которых определяется микробными биопленками, называются биопленочными инфекциями [89]. Многие хронические заболевания, связанные с инфекциями биопленки - патология зубов, тканей пародонта, средний отит, пневмония с муковисцидозом, остеомиелит, инфекции мочевыводящих путей [121,79].

Формирование биопленки - сложное динамическое движение, состоящее из нескольких этапов (рис.1):

1. Обратимое прикрепление к поверхности и перераспределение клеточной массы. Чаще всего микроорганизмы существуют в виде свободно плавающих масс или одиночных (например, планктонных) колоний. Однако в нормальных условиях большинство микроорганизмов имеют тенденцию прикрепляться к поверхностям и в конечном итоге образуют биопленку.

2. Постоянная адгезия к поверхности. На этом этапе происходит активное деление клеток с образованием кластеров клеток. По мере размножения бактериальный оникс все более прочно прилипает к поверхности, дифференцируется, обменивается генами, что обеспечивает их выживание.

3. Формирование слизистой защитной экзополимерной биопленки. После эластичного прикрепления бактерициды начинают образовывать экзополисахарид, окружающий матрикс, известный как внеклеточное полимерное вещество. Это защитная матрица или «слизь» (матрица EPS). Затем небольшие бактериальные решетки образуют исходную биопленку [111,79].

Формирование биопленки представляет собой сложное динамическое движение, состоящее из нескольких этапов (рис. 1)

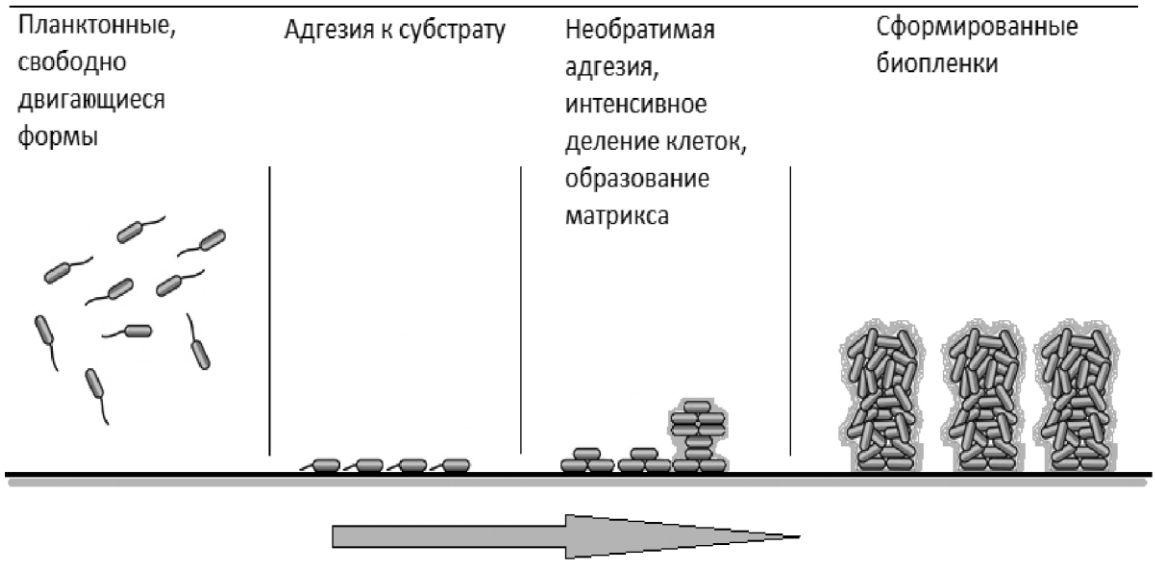

Рисунок 1.– Схема процесса формирования бактериальных биопленок (Афиногенова, 2011)

Экспериментальные лабораторные исследования показали, что, например, стафилококки, стрептококки, синегнойные палочки и кишечная палочка обычно прикрепляются друг к другу в течение нескольких минут [111]. В течение 2-4 часов бактерициды формируют прочность связанных микроколоний, продуцируют внеклеточные полисахариды. В течение 6-12 часов образуются зрелые биопленочные решетки, микроорганизмы которых обладают высокой устойчивостью к биоцидам. Такие биопленки быстро восстанавливаются после механического разрушения и в течение 24 часов вновь образуют зрелую формулу. В зависимости от появления видов бактерий и условий на трибуне количество планктонных бактерий уменьшается в течение 2-4 дней.

Первоначальное прикрепление микробной клетки к поверхности субстрата обусловлено действием электростатических, гидрофобных сил, сила Ван-дер-Ваальса и неспецифической адгезии [95]. Наблюдения *in vitro*

показали, что степень адгезии с последующим образованием биопленок наиболее выражена к таким материалам, как латекс, силикоз и поливинилхлорид [75]. Адгезия к тефлону, полиуретану, нержавеющей стали и титану менее заметна. В общей сложности этиловые материалы широко используются в медицинской практике, что является дополнительным риском образования биопленки.

Адгезия к биологическим поверхностям (к клеткам тканей, стенкам сосудов) обусловлена специфическим взаимодействием белков-адгезинов или лектинов фибрий экзоплазматического компартмента бактериальной клетки с рецепторами или определенными доменами поверхности мембраны клетки-хозяина.

После необратимой адгезии популяция микроорганизма начинает интенсивно размножаться с образованием многоклеточного слоя и синтезировать компонент экзополимерной ЭПС-матрицы, что является одним из ключевых моментов в формировании биопленки [115]. Использование лазерной конфокальной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии позволило установить, что биопленки имеют сложную трехмерную структурную организацию [81]. Состав матричной слизи варьируется в зависимости от микроорганизмов, присутствующих в ряде микроорганизмов, и включает полисахариды, белки, гликолипиды и бактериальную ДНК. В этом случае основной компонент - полисахариды (декстран, гиалуроновая кислота, целлюлоза и другие). По данным разных авторов, этановая фракция в домашних условиях составляет 40; 95% общей биопленки; содержание других химических веществ сильно варьируется и зависит от таксономической единицы бактерий, образующих биопленку _3_ Доля белка в биопленке может составлять 60%, липидов-40% и нуклеиновых кислот-1-20% [115,95]. Около 80-90% объема биопленок занято водой, поэтому все ее компоненты находятся в гидратированном состоянии. Матрица биопленки разделена каналами, заполненными водой, а также имеет

норку. По каналам транспортируются питательные вещества, и конвективные потоки кислорода проходят от внешней к внутренней части биопленки, в то время как метаболиты бактериальной клетки одновременно выводятся [115].

Формирование, рост и миграция планктонных клеточных форм для колонизации в биопленках регулируются на популяционном уровне с помощью механизмов межклеточной коммуникации - “зондирования кворума” (QS) - этого процесса коллективной координации экспрессии генов в бактериальной популяции, опосредующего специфическое поведение клеток [115]. Механизм работы QS основан на сложной иерархической регуляции целевых локусов генома бактериальной клетки. При этом регуляция осуществляется на разных уровнях воздействия: транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном. Сигнальные клетки Nao в популяции отвечают специфическим ответом. На сегодняшний день установлено, что межклеточные отношения влияют на внутрипопуляционную дифференцировку клеток, экспрессию генов вирулентности, регулируют процессы роста, характер и направление подвижности (таксист), а также на апоптоз бактерий и образование токсинов. Работу QS можно сравнить с гормональной регуляцией функциональной активности различных организмов и тканей в многоклеточном организме. Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы используют различные сигнальные системы и различные химические ретрансляторы сигналов.

Благодаря многочисленным свойствам биопленки, высокая устойчивость к факторам естественной резистентности организма, различным внешним воздействиям, антибактериальным средствам[116,111] имеет клиническое значение. Ранее было установлено, что чувствительность микроорганизмов к антибиотикам в фазе планктона составляет 10-1000 мас. % выше, чем у микроорганизмов в биопленке [90].

Значительная антибиотикорезистентность микроорганизмов в биопленках по сравнению с планктонными формами обусловлена способностью бактерий накапливать в матриксе внеклеточные ферменты, разрушающие антибиотики и химиотерапевтические препараты, а также агрегационным характером биопленок, связанным с уменьшением площади открытой поверхности их клеток. Также особую роль играет резистентный феноптип клетки и сниженный метаболизм микроорганизмов в биопленке, что достигается за счет их многослойной топографии и приводит к снижению чувствительности к антибиотикам. Идеальность строповки биопленок способствует процессам взаимосвязи с генетической информацией, включая устойчивость к противомикробной химиотерапии, благодаря тесному контракту и стабильной пространственной локализации клетки. Исследования *in vitro* показали, что уровень конъюгации в биопленках значительно выше, чем в бактериальных планктонных формах [115,111]. Кроме того, процессы конъюгации можно регулировать на уровне популяции посредством бактериальной коммуникации, например, вирулентные энтерококки используют сигнальные системы для передачи генетической информации.

Кроме того, по мнению ряда авторов, повышение стабильности форм биопленок связано с 4 основными факторами [86,91,99,87].Матрица биопленки может препятствовать диффузии, выполняя барьерную функцию;

Создание различных условий внутри микрообщества, например, снижение концентрации кислорода в глубоких слоях биопленки, приводит к образованию медленно растущих микроорганизмов; изменение pH в глубоких слоях приводит к изменению концентрации ионизированной и неионизированной форм антибиотика, что влечет за собой изменение степени его воздействия на клетки.;

Дифференцировка микроорганизмов приводит к появлению персистирующих клеток со сниженной чувствительностью к антибиотикам.

Было показано, что клетки персистера выживают после лечения некоторыми фторхинолонами [88];

У микроорганизмов в биопленке происходит экспрессия специализированных генов, ответственных за устойчивость, которые не экспрессируются в планктонных формах. Например, ген ndvB у *P. aeruginosa* обеспечивает устойчивость к тобрамицину путем кодирования ферментации, которая участвует в синтезе циклического глюклана, который связывается с тобрамицином и не позволяет реализовать бактерицидный эффект [91]. Ранее было доказано, что экспрессия этого гена наблюдается только у бактерий в составе биопленки. В ряде работ ранее было показано, что индуцированная резистентность реализует совместимость с естественными генетическими механизмами и приводит к выраженности ряда общих признаков [104, 69].

Одним из основных требований к имплантируемым медицинским устройствам является их соответствие необходимым биологическим свойствам. Например, в случае протезов кровеносных сосудов, дренажей, катетеров, искусственных линз глаза, биосенсоров и ядер. взаимодействие поверхности изделия с биологической средой должно быть минимальным, в то время как для ортопедических и зубных имплантатов, наоборот, требуется рост окружающей ткани в объем изделия [127].

Образование биопленки возможно на медицинских устройствах, таких как катетеры, эндотрахеальные трубки, внутриматочные устройства, контактные линзы и т. д. [111,96,83]. Это является этиопатогенетическим основным развитием так называемых инфекций, связанных с устройством. В Германии, одной из немногих стран, где ведется статистика инфекций, связанных с устройствами, число таких заболеваний превышает 100 000 случаев в год [92 103]. В Соединенных Штатах и Западной Европе ежегодно регистрируется более 5000100 случаев инфекций, связанных с катетерами. Каждое осложнение в виде инфекции, связанной с катетером, повышает стоимость лечения для годовалого пациента, сумма в размере 33 000,

которую необходимо потратить на дому, составляет 65 000 долларов США [97,94]. В результате система здравоохранения США вынуждена тратить около 2 миллиардов долларов в год на лечение и борьбу с осложнениями инфекций, связанных с биопленочными катетерами [76 100]. В настоящее время установлено, что биопленки являются основным фактором патогенеза заболеваний, характеризующихся хроническим воспалением [132,111]. Их обнаруживают более чем в 80% случаев хронических инфекционных заболеваний, что позволило выдвинуть концепцию хронических заболеваний как заболеваний биопленок [115,111].

1.3 Пути преодоления формирования микробных биопленок

Большинство современных исследований направлено на поиск способов преодоления устойчивости микробных биопленок к противомикробным препаратам, связанных с разработкой новых терапевтических рекомендаций, направленных на дезорганизацию биопленок и разрушение устойчивых клеток [72]. Всего предлагаемые на данный момент направления решения данной проблемы можно объединить следующим образом:

• ингибиторы системного зондирования Quorsum (QS), что приводит к нарушению межклеточной информации;

• ингибиторы, реализующие эффективную циркуляцию системы QS;

• блокирование синтезатора или разрушение полимерной матрицы;

• подготовка, влияющая на адгезию;

• механическое (физическое) воздействие.

Кроме того, использование бактерицидных агентов, действующих на структуру или функцию биопленок, может быть более эффективным, чем стандартная терапия антибиотиками.

Одним из перспективных методов предотвращения образования микробиологических пленок является использование этиотропного

антибактериального препарата в сочетании с кларитромицином (антибиотик из группы макролидов). Было обнаружено, что кларитомицин, к *которому P. aeruginosa* обладает естественной устойчивостью, уменьшал пили и подавлял подвижность *Pseudomonas aeruginosa*, а также изменял архитектуру биопленок. [106]. Показано, что комбинированное действие кларитромицина приводило к снижению содержания экзополисахаридов в матрице биопленок, уменьшалось количество альгината и гексозы, истончался гликокаликс, повышалась концентрация гексозы внутри клетки, что способствовало увеличению проникновения *Pseudomonas aeruginosa* в клетки [107].

Показано, что в матрице биопленок различных, неродственных микроорганизмов имеются фрагменты внеклеточной ДНК, содержащие ген бактериальной хромосомы и плазмиды, которые являются новой мишенью для воздействия на бактерии с целью повышения эффективности антибактериальной терапии. Таким образом, использование ДНК-матрицы в качестве дополнительной мишени в терапии позволяет повысить эффективность действия различных антибиотиков на неродственные микроорганизмы, обитающие в биопленках, снизить вероятность возникновения, распространения и сохранения резистентности к терапевтическим агентам, сократить общую продолжительность терапии и сократить продолжительность пребывания пациентов в стационаре. и снизить частоту рецидивов заболевания.

Еще одно перспективное направление борьбы с микробными биопленками - клиническое использование бактериофагов, которые помимо прямого литического действия индуцируют продукцию деполимеразы в микробных биопленках. Установлено, что положительный клинический результат после аэрозольного применения антипсевдомонадного бактериофага у пациентов с муковисцидозом связан с эффектом актинической деградации экзополисахаридного компонента матрикса биопленки, которая происходит при проникновении бактериофагов во внутренние слои биопленки. микробная биопленка. [68].

Carson L. et al. (2010) использовали литическую бактериофагию для лечения и предотвращения обработки биопленок *Proteus mirabbbilis* и *E.coli* на урологических устройствах и катетерах у урологических пациентов. Наблюдалось предотвращение образования биопленки на биоматериалах катетеров после их пропитки гидрогелевыми бактериофагами. Более того, по сравнению с необработанным контуром в 90% случаев наблюдалось отчетливое подавление образования биопленки больничными штаммами *Proteus mirabilis* и *E. coli.*

Бактериофагия также использовалась для подавления образования биопленок, образуемых *S. epidermidis* в катетерах [74]. Из поисковой работы, направленной на выявление препаратов и материалов, ингибирующих переработку консорциумов биопленок, представляет интерес исследование, по результатам которого миноциклин - ЭДТА (М-ЭДТА) предотвращает микробную колонизацию катетеров. Интересная тема заключается в том, что определения проводились как на свежеформированных, так и на зрелых биопленках. Каждый из сегментов катетеров инкубировали с различными дозами следующих растворов - стрегптокиназы, гепабрина, ванкомицина, ванкломицин-гепабрина, ЭДТА, М-ЭДТА. Эффективное снижение колонизации *S. epideermidis, S. aureus* или *Candida albicans* раствором М-ЭДТА было значительно более эффективным по сравнению с другими препаратами. Важно отметить, что эффективное подавление наблюдалось как в свежих, зрелых, так и в зрелых биопленках (Raad et al., 2003).

Новая условно-патогенная микрофлора, способная бороться с биопленками, в частности с теми, которые образуются *P. aeruginosa*, демонстрирует возможность фотодинамической эрадикации планктонных и биопленочных культур. Это называется фотодинамической дезинфекцией бактериальных патогенов.

В экспериментах *in vitro* планктонные клетки подвергались воздействию фотосенсибилизатора, связанного с метиленовым синим. Полученные исследования [102] показали, что облучение планктонных

клеток фотосенсибилизатором с использованием нетеплового диодного лазера длиной волны 670 нм, проведенное в условиях однократного воздействия, определило эффективную 100% эрадикацию микрофлоры. В настоящее время разрабатываются другие новые подходы для преодоления толерантности микробов в биопленках путем поиска различных лекарственных средств, а также комбинаций антибиотиков, которые могут проникать в матрицы биопленок, растворять их или действовать другими способами, которые могут предотвратить развитие микробных биопленок [117,70]. Комбинация ципрофлоксацина или линезолида с рифампицином оказывает ингибирующее действие *in vitro* на биопленку, образованную *E. faecalis*. Предлагается рассмотреть эту комбинацию для использования у людей с ранним инфицированием протеза, вызванным микробом этимона [85].

Способом улучшения проникновения антимикробных препаратов в микробную биопленку также может быть совершенствование форм их доставки [101]. Установлено, что липосомальный комплекс амфотерицин В проявляет выраженную активность по отношению к резистентным биопленкам, продуцируемым *Candida spp*., что позволяет использовать его при инвазивных системных микоплазмах [134].

Многие из известных методов борьбы с биопленками непригодны для использования в медицине, так как они могут нанести вред медицинским устройствам или непосредственно организму пациента. Однако поиск продолжается, и несколько вариантов могут послужить основой для дальнейших исследований. Blenookinsopp et al (1992) показали, что низковольтные электрические входы повышают эффективность нескольких коммерческих биоцидов, так что оникс атакует микроорганизмы даже в концентрациях, значительно меньших, чем минимум, необходимый для планктонных клеток. Huang et al (1998) сообщили, что ультразвуковое исследование удалило в домашних условиях 95% *Pseudomonas diminuta*, прилипших к ультрафильтрационной мембране, и продемонстрировало

эффективность ультразвука против биопленки P. aeruginosa, прилипшей к стали; кроме того, было обнаружено, что это лечение повысило эффективность гентамициновой технологии обработки биопленок. Интересным объектом для действия является экзополисахаридная матрица как важный фактор реализации устойчивости микроорганизмов в биопленках к биоцидам. Доступны различные варианты его удаления. Например, Johansen et al (1997) показали, что смесь ферментов эффективна в ингибировании активности выращенных in vitro биопленок некоторых микроорганизмов. Состав внеклеточной полимерной матрицы биопленок может быть очень изменчивым, однако предлагается идентифицировать полисахариды для определенных организмов в биопленке и воздействовать на них с помощью ферментов, которые избирательно разрушают определенные полисахариды.

В прошлом было показано, что альгинатлиаза способствует более эффективной диффузии гентамицина из альгинатного полисахарида биопленки *P. aeruginosa*. Многие другие авторы рассматривают определенные сигнальные молекулы (ацил-гомосеринлактон), специфичные для биопленок, как качество мишени. [73, 77]. Предполагается, что новые виды обработки могут быть основаны на разрушении этих систем связи между бактериями в биопленках [93, 84], однако конкретных решений найдено не было.

Используя данные о том, что молодые биопленки более восприимчивы к антибактериальным препаратам, чем старые, предлагается разработать новые неинвазивные методы диагностики раннего (доклинического) воздействия на биопленки внутренней средней массы. В свою очередь, этот дастан может более эффективно воздействовать на молодые биопленки. Большое количество лабораторий в настоящее время пытаются идентифицировать гены, которые экспрессируются или, наоборот, репрессируются во время начального формирования биопленки, что также может служить отправной точкой для появления руководства по

диагностическим тестам или разработки стратегии. подавить биопленку на генетическом уровне. Медицинская реальность только начинает понимать важность микробного сообщества, организованного в биопленках. Очевидно, что бактериальные клетки могут объединяться в специфические дифференцированные трехмерные структурные клетки, предполагая скоординированное повреждение, что их радикальность меняет преобладающие концепции в медицинской микробиологии.

На данный момент наиболее перспективными представляются следующие направления борьбы с биопленками:

• профилактика первичной инфекции имплантата,

• минимизация начальной адгезии микробных клеток,

• разработка рекомендаций по способу проникновения в матрицу биопленки различных биоцидов с целью подавления активности клеток, связанных биопленкой

• разрушение матрицы

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

В данной работе объектами исследования являются штаммы бактерий *Pseudomonas sp. 102 и Pseudomonas sp. 103*, выделенные из чины болотной (*Lathyrus palustris L.*) из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН. Для определения ростостимулирующей активности исследуемых штаммов и анализа формирования биопленок были использованы растения томата (*Solanum lycopersicum L.*) сорта «Дубок» и рапса (*Brassica napus*) сорта «Ханна» для сравнения эффективности штаммов на разных семействах.

2.2 Оборудование: электропоратор фирмы Bio-Rad модели Micropulser, флуоресцентный микроскоп Axio Imager M1 (Carl Zeiss,

Германия), термостат для выращивания бактерий в чашках Петри ТС-1/80, автоклав горизонтальный 2340МК, орбитальный шейкер ES-20. BioSan, Ламинарный шкаф, класс I, вертикальный поток, БАВ-1,5

2.3 Приготовление электрокомпетентных клеток *Pseudomonas*

Штаммы бактерий *Pseudomonas* выращивали в жидкой питательной среде в течение 2 дней при 23-25 ° С примерно до 10^9 КОЕ на мл. Затем культуру клеток разливали в стерильные колбы на 50 мл и охлаждали на снегу. Клетки осаждали на центрифуге Eppendorf 5804. Полученный осадок промывали 10% глицерином 4 раза, добавляя 40, 30, 20 и 10 мл соответственно. Во избежание заражения клеток другими микроорганизмами все операции проводились на снегу в ламинарном боксе. После последней промывки клеток глицерином в стерильном охлажденном 1 М сорбите была приготовлена суспензия. Затем их разливали в стерильные полипропиленовые эппендорфы по 50 мкл и фиксировали. Готовые компетентные клетки оставляют в морозильной камере при -70 ° С.

2.4 Электропорация компетентных клеток *Pseudomonas* (для получения флуоресцентных штаммов)

Генетическую трансформацию предварительно подготовленных компетентных клеток проводили на электропораторе Bio-Rad, модель микропульсера. Для этого использовались гальванические ячейки, в которых расстояние между электродами составляет 0,1 см. Плазмиды, выделенные методом мягкого лизиса, подвергаются дополнительной очистке смесью фенола и хлороформа. Кроме того, ДНК несколько раз повторно осаждали с последующей ее промывкой 70% - ным этиловым спиртом. Все эти действия проводятся для снижения концентрации солей, которые могут вызвать электрический пробой в кювете. Во время трансформации, как и при приготовлении компетентных клеток, все операции проводят на льду при 0 ° С. В пробирки добавляют 0,5-1 мкл раствора ДНК и компетентные клетки,

все перемешивают. Полученную смесь разливают в охлажденные кюветы, затем, выбрав соответствующий режим электропорации, через кювету пропускают электрический ток. После этого смесь клеток и ДНК смывали охлажденной средой YM и выращивали в Эппендорфе в течение 2,5 ч на шейкере при температуре 28 ° C. Инкубированную суспензию клеток осаждали коротким центрифугированием. Полученную гранулу, ресуспендированную в среде LB, равномерно распределяли стерильным стеклянным шпателем на поверхности 1,5% агаровой среды с селективным антибиотиком (гентамицин для плазмид pJN105TurboGFP и pJN105TurboRFP в концентрации 100 мг / л). Пластины с трансформированными агробактериями выращивали в течение 2 дней при температуре 23-25 ° C.

2.5 Микроскопирование корней растений

Семена растений стерилизовали 70% спиртом в течение одной минуты, а через 20 минут - 5% раствором гипохлорита натрия и проращивали в течение одной недели на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Затем проростки выдерживали при встряхивании (25 об / мин) в бактериальной суспензии (10^5 КОЕ / мл) в 50 мМ забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS, pH 7,2). Суспензии готовили с использованием двухдневных бактериальных культур, выращенных в жидкой среде YM и отмытых от среды PBS. Через 3 часа проростки промывали стерильным PBS и помещали в пробирки, содержащие 10 мл жидкой среды MS. Растения выращивали в стерильных условиях в течение 7 дней при 25 ° C и естественном освещении. Затем черенки промывали один раз стерильным PBS (5 мин при встряхивании 25 об / мин) и корни разрезали на фрагменты размером 10-15 мм для микроскопии.

Визуальное наблюдение меченых бактерий на корнях растений проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия).

Исследование влияния *Pseudomonas* на ростовые параметры растений

Семена растений стерилизовали в 70% - ном этиловом спирте в течение одной минуты, а затем в 20% - ном гипохлорите натрия в течение 10 минут. Культуру бактерий для эксперимента выращивали в течение 1 суток в жидкой среде YM до концентрации 10^9 КОЕ / мл. Эксперименты проводили для инокуляции семян следующими концентрациями бактерий: 10^3 КОЕ / мл, 10^4 КОЕ / мл и 10^5 КОЕ / мл. Семена выдерживали в суспензии бактерий в течение 1 мин. Затем привитые семена выкладывали на влажную фильтровальную бумагу в стерильные чашки Петри. Некоторые семена были оставлены без прививки в качестве контроля. Посуду инкубировали в течение 1 недели при комнатной температуре. Через неделю длину корней измеряли и сравнивали с длиной корней контрольных саженцев. Среднее значение, стандартное отклонение и до доверительного интервала проводили с помощью программы MS Office Excel 2007.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение ростостимулирующей активности штаммов *Pseudomonas sp. 102, Pseudomonas sp. 103* по отношению к растениям томата (*Solanum lycopersicum L.*) и рапса (*Brassica napus*).

Для исследования влияния штаммов на корневую систему растений, семена инокулировали следующими концентрациями бактерий: 10^3 КОЕ/мл, 10^4 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/мл. Через неделю измеряли длину корней и сравнивали с длиной корней контрольных проростков (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние концентрации бактерий на длину корней растений томата и рапса

Штамм	Концентрация, КОЕ/мл	Среднее значение длины корней, мм (томат)	Среднее значение длины корней, мм (рапс)
Pseudomonas sp. 102	***10^3***	17±0,5	35±2,4
	10^4	26±2,1	23±1,5
	10^5	28±2,3	41±2,5
Pseudomonas sp. 103	***10^3***	20±1,6	50±2,3

	10^4	36±2,6	77±3,1
	10^5	35±1,1	85±2,8
Контроль		15±2,8	57±3,8

При обработке семян томата суспензиями *Pseudomonas sp. 102* и *Pseudomonas sp. 103* концентрацией 10^4 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/мл среднее значение длины корней превосходила контроль почти в 2 раза. В остальных вариантах инокуляции семян томата стимулирующего действия не наблюдалось.

Таким образом, было показано, что обработка *Pseudomonas sp. 102* не оказывала положительного влияния на рост растений рапса вне зависимости от концентрации бактерий. В случае растений, обработанных штаммом *Pseudomonas sp. 103* в концентрациях 10^4 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/мл, длина корней опытных проростков превосходила контроль в 1,5 раза.

Полученные результаты показали, что *Pseudomonas sp. 102* и *Pseudomonas sp. 103* обладают ростостимулирующей активностью по отношению к растениям томата и рапса и могут быть использованы в качестве биоудобрений для стимуляции роста корней в концентрациях 10^4 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/мл.

Рис 2. Проростки томатов через неделю после инокуляции (а,б,в)

А - контроль

Б - *Pseudomonas* sp. *102*, 10^5 КОЕ на 1 мл

В - *Pseudomonas* sp. *103*, 10^5 КОЕ на 1 мл

3.2 Получение маркированных флуоресцентными белками штаммов для их детекции.

При использовании микроорганизмов в составе биоудобрений очень часто возникает необходимость для более детального исследования взаимодействия с корнями растений без воздействия на их жизнедеятельность.

Для этого применяются такие маркерные гены, как *lacZ*, *gusA*, *celA*, *luc* и *luxAB*, которые вводятся в геном бактерии для прижизненного детектирования. На данный момент в исследованиях наиболее популярными

и часто используемыми маркерами являются гены зеленого (GFP) и красного (RFP) флуоресцирующего белка.

Ранее была получена генетическая конструкция на основе вектора pJN105, в котором содержатся гены флуоресцентных белков из серии TurboColors: TurboGFP и TurboRFP [112] .Плазмида pJN105, служащая основой для конструкции, имеет широкий круг хозяев и является производной плазмиды pBBR1. Которая также не принадлежит ни к одной из известных групп несовместимости, т.е. вектор с данным репликоном не должен конфликтовать ни с одной из известных плазмид. При получении меченной бактериальной клетки флуоресцирующим белком, у которого ген экспрессируется с плазмиды данное свойство является важным условием. Так как наличие конфликта, безусловно, приведет к стабильной элиминации или вносимой векторной конструкции или хозяйкой плазмиды, что в свою очередь может привести к изменению фенотипа микроорганизма. Это является важным условием при исследовании клубеньковых бактерий, у которых большая часть генома составляет именно плазмиды.

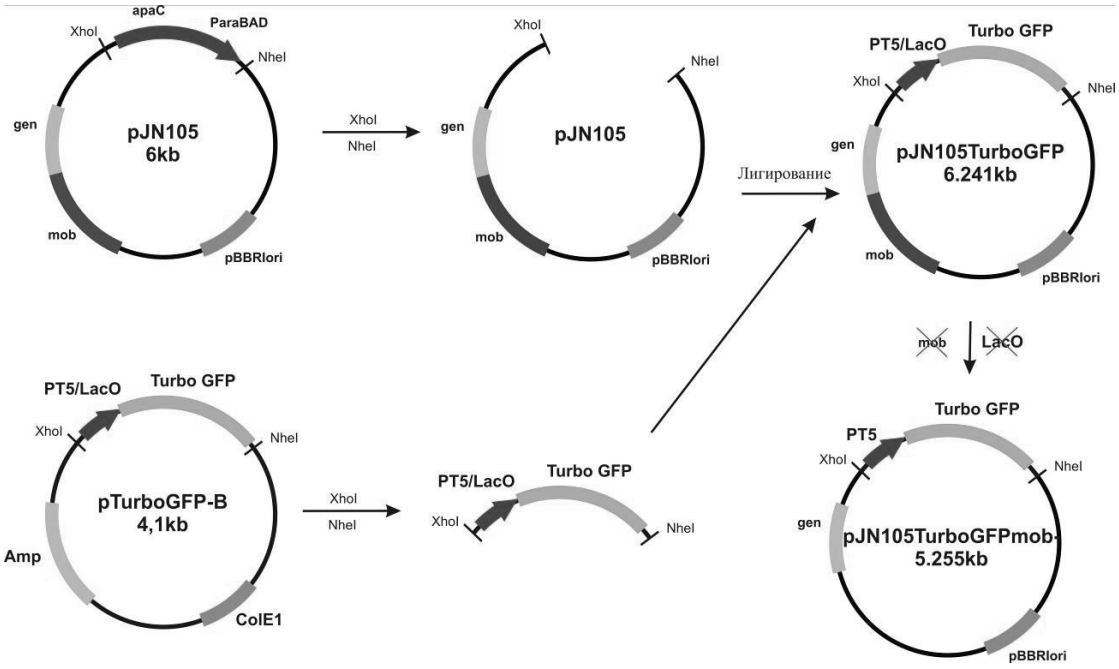

Рисунок 3- Схема получения экспрессирующей векторной конструкции, содержащей ген TurboGFP

С помощью электропорации были трансформированы штаммы *Pseudomonas 102*, *Pseudomonas 103*. Эффективность трансформации проверяли по количеству клеток и она составила около $4{,}5x10^4$ клеток/1 мкг плазмидной ДНК. Было выявлено, что при инокуляции растений томата трансформированными штаммами, после выращивания на песке в течение 7 дней, некоторое количество бактерий теряет маркерную плазмиду, но, в целом, количество флуоресцентно меченых клеток остается достаточным для исследования взаимодействия *Pseudomonas* с корнями растений.

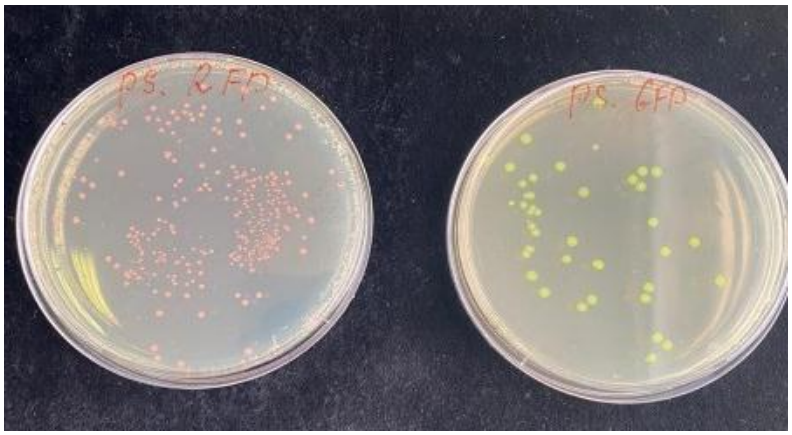

Рисунок 4 - *Pseudomonas*, маркированные TurboGFP и TurboRFP

3.3 Анализ биопленок, образуемых штаммами на корнях растений-макросимбионтов.

Была исследована эффективность биопленкообразования флуоресцентно мечеными штаммами псевдомонад на корнях растений томата и рапса.

Полученными конструкциями с помощью электропорации были трансформированы штаммы *Pseudomonas 102*, *Pseudomonas 103* (рис. А,Б) в результате чего данные бактерии приобрели зеленое и красное свечение в ультрафиолетовом свете.

Анализ уровня колонизации корней после 7 сут. совместного культивирования показал значительное увеличение «заякорившихся» на корнях бактерий в случае использования концентрации 10^5 КОЕ на 1 мл (рис.Д,Ж). При этом через 3-4 сут. микроскопирование выявило образование на корнях растений бактериальных агломераций и микроколоний. Также было показано, что штаммы псевдомонад образует биопленки преимущественно на поверхности корней растений томата (Б,Е), в отличие от опытов, проведенных на рапсе, у которого бактерии имели большее сродство к корневым волоскам (рис.Г ,З)

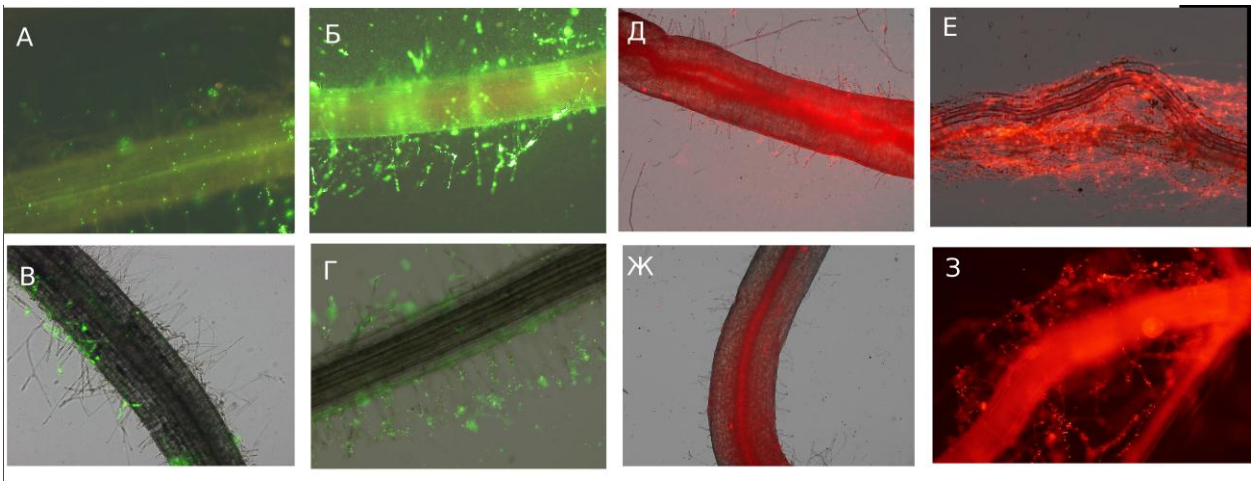

Рис 5. Исследование формирования биопленок штаммами *Pseudomonas* на поверхностях корней томата (*olanum lycopersicum L.*) и рапса (*Brassica napus L.).*

А - *Pseudomonas sp. 102*, 10^4 КОЕ на 1 мл, томат

Б - *Pseudomonas sp. 102*, 10^5 КОЕ на 1 мл, томат

В - *Pseudomonas sp. 102,* 10^4 КОЕ на 1 мл, рапс

Г - *Pseudomonas sp. 102,* 10^5 КОЕ на 1 мл, рапс

Д - *Pseudomonas sp. 103,* 10^4 КОЕ на 1 мл, томат

Е - *Pseudomonas sp. 103,* 10^5 КОЕ на 1 мл, томат

Ж - *Pseudomonas sp. 103,* 10^4 КОЕ на 1 мл, рапс

З - *Pseudomonas sp. 103,* 10^5 КОЕ на 1 мл, рапс

Заключение

Благодаря действию внеклеточных метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* можно улучшить всхожесть семян, ростовые качества растений, улучшить урожайность и защитить растения от фитопатогенов.

Результаты сравнительного анализа в рамках данной работы показали, что ризосферные микроорганизмы рода *Pseudomonas* обладают способностью к биопленкообразованию на корнях томата и рапса, а также могут стимулировать рост этих растений. Следовательно, изучаемые штаммы могут найти широкое применение в сельском хозяйстве при выращивании данных культур.

При использовании микроорганизмов в составе биоудобрений очень часто возникает необходимость для более детального исследования взаимодействия с корнями растений без воздействия на их жизнедеятельность. С этой целью нами были получены флуоресцентно меченые штаммы *Pseudomonas.*

ВЫВОДЫ

1.Определена ростостимулирующая активность штаммов *Pseudomonas sp. 102, Pseudomonas sp. 103* по отношению к растениям томата *(Solanum lycopersicum L.)* и рапса *(Brassica napus)*.Выявлено, что длина опытных

корней проростков,обработанных штаммом *Pseudomonas sp. 103* в концентрациях 10^4 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/мл, превзошла контроль в 1,5 раза. Показано, что *Pseudomonas sp. 102 и Pseudomonas sp. 103* обладают ростостимулирующей активностью по отношению к растениям томата и рапса и могут быть использованы в качестве биоудобрений для стимуляции роста корней в концентрациях 10^4 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/мл.

2. Получены маркированные флуоресцентными белками штаммы для их детекции. Методом электропорации были трансформированы штаммы *Pseudomonas 102, Pseudomonas 103* . В результате чего данные бактерии приобрели зеленое и красное свечение в ультрафиолетовом свете.

3. Проведен анализ биопленок, образуемых штаммами на корнях растений-макросимбионтов. Выявлено образование на корнях растений бактериальных агломераций и микроколоний. Показано, что штаммы псевдомонад образует биопленки преимущественно на поверхности корней растений томата ,в отличие от опытов, проведенных на рапсе, у которого бактерии имели большее сродство к корневым волоскам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.Alstrom, S. 1991. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere Pseudomonas. J. Gen. Appl. Microbiol., 37: 495-501.

2.Asha, B.B., Chandra, N.S., Shankar, U.A.C., Srinivas, C. and Niranjana, S.R. 2011. Biological control of F. oxysporum f. sp. lycopersici causing wilt of tomato by Pseudomonas fluorescens. Int. J. Microbiol. Res., 3: 79-84.

3.Baligh, M., Delgado, M. A. and Conway, K. E. 1999. Evaluation of Burkholderia cepacia strains: root colonization of Catharanthus roseus and in vitro inhibition of selected soil borne fungal pathogen. In:Proceedings of Oklahoma Academic Science, 79:19-27.

3.Baligh, M., Delgado, M. A. and Conway, K. E. 1999. Evaluation of Burkholderia cepacia strains: root colonization of Catharanthus roseus and in vitro inhibition of selected soil borne fungal pathogen. In:Proceedings of Oklahoma Academic Science, 79:19-27.

4. Barett, E. L., Solanes, R. E., Tang, J. S. and Palleroni, N. J. 1986. Pseudomonas fluorescens, its resolution into distinct component groups and relationship of these to other P. fluorescens biovars to P. putida and to psychrophilic pseudomanads associated with food spoilage. J. Gen. Microbiol., 130: 2709- 2721.

5. Boer, W. D., Verheggen, P., Gunnewiek, P. J. A., Kowalchuk, G. A. and Veen, G. A. 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. Appl. Environ. Microbiol., 69: 535-544.

6.Borowitz, J. J., Stankie-Dicz, M., Lewicka, T. and Zukowska, Z. 1992. Inhibition of fungal cellulase, pectinase and xylanase activity of plant growth promoting fluorescent pseudomonads. Bull. OILB/SROP, 15: 103-106.

7.Budzikiewicz, H. 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. FEMS Microbiology Reviews, 10: 209-228.

8.Burr, T. J., Schroth, M. N. and Suslow, T. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of Pseudomonas fluorescens and P. putida. J. Phytopatho, 68: 1377−1383.

9.Chen, C., Be-langer, R. R., Benhamou, N. and Paulitz,T. C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and Pythium aphanidermatum. Physiol. Mol. Plant Pathol., 56: 13-23. Chen, Y., Jurkevitch, E., Bar-Ness, E. and Hadar, Y. 1994. Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. Soil Sci. Soc. Am. J., 58: 390-396.

10.Choi, O., Kim, J., Jeong, Y., Moon, J. S., Park, C. S. and Hwang, I. 2008. Pyrroloquinoline Quinone is a plant growth promotion factor produced by Pseudomonas fluorescens B16. Plant Physiol., 146: 657-668.

11.Corbett, J. R. 1974. Pesticide design. In: Voisard, C. (eds.). The Biochemical Mode of Action of Pesticides pp 44-86. Academic Press, Inc, London.

12.De-Curtis, F., Lima, G., Vitullo, D. and DeCicco, V. 2010. Biocontrol of Rhizoctonia solani and Sclerotium rolfsii on tomato by delivering antagonistic bacteriathrough a drip irrigation system. Crop Prot., 29: 663-670.

13.Deepti, D. and Johri, B. N. 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. Curr. Sci., 85: 1693-1703.

14.Defago, G., Berling, C. H., Borger, U., Keel, C. and Voisard, C. 1990. Suppression of black rot of tobacco by a Pseudomonas strain: Potential applications and mechanisms, In: Hornby, D., Cook, R. J. and Henis, Y. (eds.). Biological Control of Soil Borne Plant Pathogen. CAB International, pp. 93-108.

15.Dekkers, L. C., Mulders, I. H. M., Phoelich, C. C., Chin, A., Woeng, T. F. C., Wijfjes, A. H. M. and Lugtenberg, B. J. J. 2000. The colonization gene of the tomato-Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici biocontrol strain Pseudomonas fluorescens WCS 365 can improve root colonization of other wild-type Pseudomonas spp. bacteria. Mol. PlantMicrobe Interac., 13: 1177-1183.

16.Demange, P., Wendenbaum, S., Bateman, A., Dell, A. and Abdallah, M. A. 1987. Bacterial siderophores: Structure and physicochemical properties of pyoverdins and related compounds. In: Winkleman, G., Van-der, H. D. and Neilands, J. B. (eds.). Iron Transport in Microbes, Plants and Animals, VCH chemie, Weinheim,pp. 167-187.

17.Dowling, D. N. and O'Gara, F. 1994. Metabolites of Pseudomonas involved in the biocontrol of Plant Disease. Trends Biotechnol., 12: 133–141.

18.Duijff, B. J., Gianinazzi, P. V. and Leemanceau, P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol Pseudomonas fluorescens WCS417r. New Phytol., 135: 325-334. Dwivedi, D. and Johri, B. N. 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. Curr. Sci., 85: 1693-1703.

19.Efri, S. 1994. Analisis Aplikasi Pseodomonads kelompok fluorescens dan Trichoderma viridae Pers. Ex Gray untuk pengendalian layu fusarium pada tomat (Application analysis of fluorescent pseudomonads and Trichoderma viride Pers. Ex. Gray to control tomato Fusarium wilt disease). M. Sc. thesis, Bogor Institute of Agriculture.

20.Gehring, P. J., Noton, R. J. and Watanabe, P. G. 1993. Solvents, fumigants and related compounds. In: Hayer, W. J. and Laws, E. R. (eds.). Handbook of Pesticides Toxicology. pp 646-649. Academic Press, Inc, San Diego, California,

21.Gupta, A., Meyer, J. M. and Goel, R. 2002. Development of heavy metal resistant mutants of phosphate solubilizing Pseudomonas sp. NBRI 4014 and their characterization. Curr. Microbiol., 45: 323-327.

22.Gutterson, N., Layton, T. J. and Warren, G. J. 1986. Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonad. J. Bacteriol, 165: 696-703.

23.Hamill, R. L., Elander, R. P., Mabe, J. A. and Gorman, M. 1970. Metabolism of tryptophan by Pseudomonas aureofaciens. III. Production of substituted pyrrolnitrins from tryptophan analogues. App. Microbiol, 19: 721-725.

24.Handelsman, J. and Stabb, E. V. 1996. Biocontrol of soil borne plant pathogens. Plant Cell,8: 1855-1869.

25.Harbone, J. B. 1983. Toxins of plant fungal interactions. In: Keeler R.F. (eds.). Plant Fungal Toxins. pp 743-782. Marcel Dekker, New York.

26.Heydari, A. and Pessarakli, M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. J. Biol. Sci.,10: 273-290.

27.Hildebrand, D. C., Schroth, M. N. and Sand, D. C. 1992. Pseudomonas. In: Schad, N. W. (eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. pp 60-80. International Book Distributing Co. Lucknow.

28.Holt, J. G., Kreig, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1984. Bergey's Mannual of Determinative, pp. 750-770.Williams and Wilkins, Baltimore and London

29.Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1979. Control of Rhizoctonia solani on cotton seedlings with Pseudomonas fluorescens and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology., 69: 480-482.

30.Kiely, P. D., Haynes, J. M., Higgins, C. H., Franks, A., Mark, G. L., Morrissey, J. P. and O'Gara, F. 2006. Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. Microbiol. Ecol., 51: 257-266.

31.Kloepper, J. W. and Schroth, M. N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In Station de pathologie vegetale et phyto-bacteriologie (ed.), Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. II. Gilbert Clarey, Tours, France, 879-882

32.Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. N. (1980a). Pseudomonas siderophores: A mechanism explaining disease suppressive soils. Curr. Microbiol., 4: 317-320.

33.Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. N. (1980b). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobactria. Nature, 286: 885-886.

34.Kumar, B. S. and Dubey, H. S. 1993. Siderophore production by a plant growth promoting fluorescent pseudomonad RBT13. Indian J. Microbiol., 33: 61-65.

35.Langrimini, L. M. and Rothstein, S. 1987. Tissue specificity of tobacco peroxidase isoenzyme and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. Plant Physiol., 84: 438-442.

36.Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofman, D., Kempf, H. J. and VanPee, K. H. 2000. Natural products with antifungal activity from Pseudomonas biocontrol bacteria. Pest Manag. Sci., 56: 688-695.

37.Loper, J. E. and Henkels, M. D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to Pseudomonas putida in the rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol., 65: 5357- 5363.

38.M'Piga, P., Belanger, R. R., Paulitz, T. C. and Benhamou, N. 1997. Increased resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicislycopersici in tomato plants treated with the endophytic bacterium Pseudomonas fluorescens strain. Physiol. Mol. Plant Pathol., 50:301-320.

39.Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. C., VelazquezSepulveda, I. and Santoyo, G. 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (Physalis ixocarpa) and their detection in the rhizosphere. Genet Mol. Res., 9: 2372- 2380.

40.Miller, M. J, 2008. Siderophores (microbial iron chelators) and siderophore-drug conjugates (new methods for microbially selective drug delivery). M. Sc. thesis, University of Notre Dame

41.Nishida, M., Matsubara, T. and Watanabe, N. 1965. Pyrrolnitrin, a new antifungal antibiotic. pp. 17–24. In: NowakThompsan, B., Gould, S. J. and Loper, J. E. (eds.). Characterization of the Pyoluteorin Biosynthetic Gene Cluster of Pseudomonas fluorescens Pf-5, Gene, Vol-4. Spinger Verlag.

42.O'Sullivan, D. J. and O'Gara, F.1992. Traits of fluorescent Pseudomonas spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol. Rev., 56: 662–676.

43.Palleroni, N. J., Kunisawa, R. and Contopoulo, R. 1973. Nucleic acid homologies in the genus, Pseudomonas. Int J. Syst. Bacteriol, 23: 333-339.

44.Peitr, S. J. 1991. Inhibition of culture filtrate toxicity and hydrolase activity of phytopathogenic Fusarium spp. by plant growth promoting Pseudomonas fluorescens. pp. 147-151. In: Keel, C., Koller, B. and Defago, G. (eds). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Progress and Prospects 10 BC/WPRS.

45.Radjacommare, R., Nandakumar, R., Kandan, A. and Samiyappan, R. 2004. Association of the hydrolytic enzyme chitinase against Rhizoctonia solani in rhizobacteria treated rice plants. J. Phytopathol, 153: 36-43.

46.Ramette, A., Moenne, L. Y. and Defago, G. 2003. Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. FEMS Microbiol Ecol., 44: 35-43

47.Rao, V. S., Sachan, I. P. and Johri, B. N. 1999. Influence of fluorescent pseudomonads on growth and nodulation of lentil (Lens esculentus) in Fusarium infested soil. Indian J. Microbiol, 39: 23-29

48.Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moenne, L. Y. and Defago, G. 2007. Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection. New Phytologist, 173: 861– 872.

49.Rovira, A. D. and Davey, C. B. 1974, Biology of the rhizosphere. pp. 153-204. In: Carson, E.W.(eds.). The Plant Root and its EnvironmentVol-1. University Press of Virginia.

50.Ryu, C. M., J. F. Murphy, K. S. Mysore, and J. W. Kloepper. 2004. Plant growthpromoting rhizobacterial systemically protect Arabidopsis thaliana against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. The Plant J. 39:381–39

51.Saikia, R., Singh, K. and Arora, D. K. 2004. Suppression of Fusarium-wilt and charcoal rot of chickpea by Pseudomonas aeroginosa RsB29. Indian J. Microbiol., 44: 181-184

52.Schippers, B., Bakker, A. W. and Bakker, A. H. M. 1987. Interactions of isolates and beneficial rhizosphere microorganism and the effect of cropping practice. Annu. Rev. Phytopathol., 25: 339-338.

53.Sheath, P. H. A., Stevens, M. and Sackin, M. J. 1981. Numerical taxonomy of Pseudomonas based on published records of substrate utilization. Anton. Van Leeuw., 47: 423-448.

54.Stolp, H. and Gadkari, P. 1981. Non-pathogenic members of the genus, Pseudomonas. pp.719-741.In: Scher, F. (eds.). The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, Vol-I. Springer Verlag, Berlin.

55.Suneesh, K. 2004. Biodiversity of fluorescent pseudomonads in soils of moist deciduous forests of Western Ghats of Uttara Kannada district. M. Sc. thesis, University of Agricultural Sciences, Dharwad.

56.Suryakala, D., Maheshwaridevi, P. V. and Lakshmi, K. V. 2004. Chemical characterization and in vitro antibiosis of siderophores of rhizosphere fluorescent pseudomonads. Indian J. Microbiol., 44: 105-108.

57.Thomashow, L. S., Bonsall, R. F. and Weller, D. M. 1997. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. (eds.). Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington, DC, pp 493–499.

58.Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu.Rev.Phytopathol., 36: 453- 483.

59.Vanpeer, R. and Schippers, S. 1989. Plant growth and response to bacterization with selected Pseudomonas spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. Can. J. Microbiol., 81: 728-734.

60.Vanpeer, R., Neimann, G. J. and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation of Pseudomonas sp. WCS 4178. Phytopathol., 81: 728-734.

61.Voisard, C., Keel, O., Haas, P. and Defago, G. 1989. Cyanide production by Pseudomonas fluorescens helps to suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic condition. Eur. Microbiol J., 8: 351-358.

62.Vrany, J. and Fiker, A. 1984. Growth and yield of potato plants inoculation with rhizosphere bacteria. Folia Microbiol., 29: 248-253.

63.Walley, F. L. and Germida, J. J. 1997. Response of spring wheat (Tritiucm aestivum) to interactions between Pseudomonas sp. and Glomus clarum NT-4. Biol. Ferti. Soils, 24: 365-371.

64.Weller, D., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M. and Thomashow, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol, 40: 309-348.

65.Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot., 52: 487-511.

66.Zdor, R. E. and Anderson, A. J. 1992. Influence of root colonizing bacteria on the defense response of bean. Plant. Soil., 140: 99- 107.

67.Aparna, M.S. Biofilms: microbes and disease / M.S. Aparna, S. Yadav // Braz. J. Infect. Dis. – 2008. – V. 12(6) – P.526–530

68.Azeredo, J. The use of phages for the removal of infectious biofilms / J. Azeredo, I.W. Sutherland // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2008. –V. 9 (4) – P. 261–266.

69.Bagge, N. Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production / N. Bagge // Antimicrob Agents Chemother. – 2004. –V. 48 – P. 1175–87.

70.Balestrino, D. Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution / D. Balestrino, B. Souweine, N. Charbonnel // Nephrol. Dial. Transplant. – 2009. –V. 24 – P. 3204–3209

71.Carson, L. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of Proteus mirabilis and Escherichia coli / L. Carson, S.P. Gorman, B.F. Gilmore // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2010. – V. 59 (3) – P. 447–455.

72.Compans, R.W. Current Topics in Microbiology and Immunology / R.W. Compans, M.D. Cooper // Curr Top Microbiol Immunol. Series Editors. – Vol. 322. – 2003. – P. 159–172.

73.Conlon, K. M. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis / K. M. Conlon, H. Humphreys, J. P. O'Gara // J Bacteriol.– 2002. – V. 184 – P. 4400–4408.

74.Curtin, J.J. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by Staphylococcus epidermidis / J.J. Curtin, R.M. Donlan // Antimicrob Agents Chemother. – 2006. – V. 50 – P. 1268–1275. 109

75.Darouiche, R.O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence / R.O. Darouiche // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V. 33(9) – P. 1567– 1572.

76.Dimick, J.B. Increased resource use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit / J.B. Dimick, R.K. Pelz, R. Consunji // Arch. Surg. – 2001. – V. 136 – P. 229–234.

77.Dong, Y.H. A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependent biofilm decay in Pseudomonas aeruginosa / Y.H Dong [et al.] // Commun Integr Biol. – 2008. – V.1 – P. 88-96

78.Donlan, R.M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process / R.M. Donlan // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V. 33(8) – P. 1387– 1392.

79.Donlan, R.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – V. 15(2) – P. 167–193.

80.Donlan, R.M. Biofilm elimination on intravascular catheters: important consideration for the infectious disease practitioner / R.M. Aparna // Healthcare epidemiology. – 2011. – V. 52 (15) – P. 1038–1043.

81.Flemming, H.C. Control of biofilms in industrial waters and processes / H.-C. Flemming, T. Griebe // Biofouling of Industrial Waters and Processes. John Wiley and Sons Ltd. Chichester. – 2000. – P. 125–141.

82.Johansen, C Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms / C Johansen, P Falholt, L. Gram // App. Environ. Microbiol. – 1997. – V 63 – P. 3724–3728.

83.Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cell Microbiol. – 2009. – V. 11(7) – P. 1034–1043.

84.Haugo, A. J. Vibrio cholerae Cyt R is a repressor of biofilm development / A. J. Haugo, P. I. Watnick // Mol. Microbiol. – 2002. – V. 45. – P. 471–483.

85.Holmberg, A. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against Enterococcus faecalis in biofilms / A. Holmberg, M. Morgelin, M. Rasmussen // J. Antimicrob. Chemoter. – 2012. – V. 67 (2) – P. 433–439.

86.Huang, C.T. Spatial patterns of alkaline phosphaase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation / C.T. Huang // Appl Environm Microbiol. – 1998. – V. 64 – P. 1526-31. 111

87.Jenal, U. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria / U. Jenal, J. Malone // Ann Rev Genetics. – 2006. – V. 40 – P. 385–407.

88.Kaldalu, N. Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in Escherichia coli transcription profile / N. Kaldalu, R. Mei, K. Lewis // Antimicrob Agents Chemother. – 2004. – V. 48 – P. 890-6.

89.Lynch, A.S. Bacterial and fungal biofilm infections / A.S. Lynch, G.T. Robertson // Annu. Rev. Med. – 2008. – V. 59 – P. 415–428.

90.Mah, T.F. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents / T.F. Mah, G.A. O'Toole // Trends in Microbiology. – 2001. – V. 9 – P. 34–9.

91.Mah, T.F. A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance / T.-F. Mah // Nature. – 2003. – V. 426 – P. 306–10.

92.Mashburn-Warren, L.M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes / L.M. Mashburn-Warren, M. Whiteley // Molecular Microbiology. – 2006. – V. 61(4) – P. 839–846.

93.Miller, A. A. Repression of virulence genes by phosphorylation-dependent oligomerization of CsrR at target promoters in S. pyogenes / A. A. Miller, N. C. Engleberg, V. J. DiRita // Mol. Microbiol. – 2001. – V.40 – P. 976–990.

94.Orsi, G.B. Hospital-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infection: increased hospital stay and direct costs / Orsi G.B. [et al] // Infect. Control Hosp. Epidemiol. – 2002. – V. 23 – P. 190–197. 113 197.O'Toole, G. A.Biofilm formation as microbial development / G. A. O'Toole, H. Kaplan, R. Kolter // Annu Rev Microbiol. – 2000. –V. 54 – P. 49–79.

95.Pace, J.L. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy / J.L. Pace. – Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. – 495 p.

96.Pascual, A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs / A. Pascual // Clin. Microbiol. Infect. – 2002. – V. 8(5) – P. 256–264.

97.Pittet, D. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients: excess length of stay, extra costs and attributable mortality / D. Pittet, D. Tarara, R. P. Wenzel // JAMA. – 1994. – V. 271 – P. 1598–1601.

98.Raad, I. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces / I. Raad, I. Chatzinikolaou, G. Chaiban // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – V. 47(11) – P. 3580–3585.

99.Ren, D. Gene expression in Escherichia coli biofilms / D. Ren // Appl Microbiol Biotechnol. – 2004. – V. 64 – P. 515–24.

100.Rogers, K.L. Coagulase-negative staphylococcal infections / K.L. Rogers, P.D. Fey, M.E. Rupp // Infect. Dis. Clin. North. Am. – 2009. – V. 23 – P. 73–98.

101.Smith, K. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of Staphylococcus aureus / K. Smith [et al.] // J. of Med. Microb. – 2008. – V. 57 – P. 1018–1023.

102.Street, C.N. In vitro photodynamic eradication of Pseudomonas aeruginosa in planktonic and biofilm culture / C.N. Street, A. Gibbs, L. Pedigo // Photochem. Photobiol. – 2009. – V. 85(1) – P. 137–143.

103.Trampuz, A. Infections associated with orthopedic implants / A. Trampuz, A. F. Widmer // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2006. – V. 19(4) – P. 349–356.

104.Whiteley, M. Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms / M. Whiteley // Nature. – 2001. – V. 413 – P. 860–4.

105.Wolcott, R. The polymicrobial nature of biofilm infection / R. Wolcott [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2013. – V. 19(2) – P. 107–112.

106. Wozniak, D.J. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on Pseudomonas aeruginosa / D.J. Wozniak, R. Keyser // Chest. – 2004. – 125 (Suppl.). – P. 62–69.

107.Yasuda, H. Interaction between biofilms formed by Pseudomonas aeruginosa and clarithromycin / H. Yasuda [et al] // Antimicrob Agents Chemother. – 1993. – V. 37 – P. 1749–55.

108.Yasuda, H. Interaction between clarithromycin and biofilms formed by Staphylococcus epidermidis / H. Yasuda [et al] // Antimicrob Agents Chemother. – 1994. – V. 38 – P. 138–41.

109. Афиногенов, Г.Е. Антимикробные полимеры / Г.Е. Афиногенов, Е.Ф. Панарин. – СПб.: Гиппократ, 1993. – 264 с.

110.Афиногенова, А.Г. Влияние бигуанидов над формирование стрептококковой биопленки над модели культуры клеточка фибробластов кожи эмбриона человека / А.Г. Афиногенова, К.Б. Грабовская, Е.В. Кулешевич // Инфекции в хирургии. – 2011. – № 1. – С. 3–11.

111.Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки рана / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. –№ 3 (61). – С. 119–125.

112.Баймиев Ан.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro //* Молекулярная биология. 2011. Т. 45, № 6. С. 984–991.

113. Бехало, В.А. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок / В.А. Бехало [и др.] // Журнал. микробиолог. – 2010. – № 4. –С. 97–105.

114.Бондаренко, В.М. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл / В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, О.Г. Орлова // Журнал. микробиолог. – 2010. – № 6. – С. 66–70.

115. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 4–15.

116.Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и

системный регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. –2004. – Т. 40. – № 11. – С. 1445–1456.

117. Караев, З.О. Влияние лекарственных препаратов на образование биопленок / З.О. Караев, Л.Р. Мамеждова // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – № 3. – С. 10–12.

118.Комаров, Ф.И. Биохимические исследования в клинике / Ф.И. Комаров, Б.Ф. Коровкин, В.В. Меньшиков. – Элиста: АППрет Джангар, 1999. – 250 с.

119.Лагун, Л.В. Интенсивность образования микробных биопленок микроорганизмами, выделенными пари пиелонефритах и мочекаменной болезни / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский, С.В. Жавороник // Медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 64–67.99

120. Лиходедов, В.Г. Рояль эндотоксина грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии / В.Г. Лиходедов, Н.Д. Ющук, М.Ю. Яковлев // Архивист патологии. – 1996. – № 2. – С. 813.

121.Лямин, А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективный / А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестуков // Клинч. микробиолог. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14. – № 1. – С. 17–22.

122.Лямин, А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными биопленками / А.В. Лямин, Е.А. Ботклин, А.В. Жестков // Клинч. микробиолог. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 268–274.

123.Маянский, А.Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуфляция, отторжение / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь // Журнал. микробиолог. – 2011. – № 1. – С. 101–108.100

124.Медицинские лабораторные технологии / плод рейд. А.И. Карпищенко. –Справочник. Т. 2. – С-Пб.: Интермедика, 2002. – 600 с.

125.Минаева, О.М. Антагонистическое действие над фитопатогенные грибы и стимулирующее влияние на рост, и развитие растений формальдегид утилизирующих бактерий *Pseudomonas sp*. В-6798 / О.М. Минаева, Е.Е. Акимова, С.Ю. Семенов // Вестник ТГУ. Биология. – 2008. – № 2 (3). – С. 28–42.

126.Михайлова, Е.С. Способность к формированию биопленок у микроорганизмов, выделенных из верхних отделов ЖКТ у больных хроническим холециститом и ЖКБ / Е.С. Михайлова [и др.] // Успехи современного естествознания. –2009. – № 7. – С. 76–77.

127.Ремеева, А.А. Методические особенности оценки адгезии тромбоцитов человека и кролика на поверхность полимерных материалов методами оптической и сканирующей электронной микроскопии / А.А. Ремеева, Е.А Немец, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2008, № 2, 38-45. 103

128.Романова, Ю.М. Бактериальная биопленка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиол. – 2011. – № 3. – С. 99–109.

129.Романова, Ю.М. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками / Ю.М. Романова [и др.] // Вестн. РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31–39.

130.Смирнова, М.Ю. Синтез и исследование новых биологически активных полимеров – полимерных кетиминовых производных антибиотика доксициклина / М.Ю. Смирнова, М.В. Соловский // Материалы конференции для студентов и молодых ученых «Политехнический фестиваль», 16–17 декабря 2012 г. – СанктПетербург, 2012. – С. 165–167.

131.Смирнова, Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – № 4. – С. 435–446.

132.Товмасян, А.С. Значение симбиотических взаимодействий биогенного стрептококка при хроническом тонзиллите: автореферат дисс. … канд. мед. наук / А.С. Товмасян. – М., 2009. – 24 с.

133.Чеботарь, И.В. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14. – № 1. – С. 51– 58.

134.Честнова, Т.В. Современные представления о физико-химических особенностях существования бактерий в составе биоплёнок / Т.В. Честнова, Н.В. Серёгина // Общественное здоровье и здравоохранение: профилактическая и клиническая медицина // XXXXV научно-практическая конференция преподавательского состава ТулГу / ТулГУ, 2009. – С. 138.

АНТИПЛАГИАТ
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Башкирский государственный медицинский университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Амирханова Элена Эдуардовна
Самоцитирование рассчитано для: Амирханова Элена Эдуардовна
Название работы: Формирование биопленок штаммами Pseudomonas на биологических объектах (корнях растений)
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ **ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ:** НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	24.53%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	24.68%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	52.68%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	74.84%
ЦИТИРОВАНИЯ	22.79%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.48%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 17.06.2021

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 17.06.2021 07:35

Модули поиска: ИПС Адилет; Модуль поиска "БГМУ"; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи: 17.06.2021 г.

Подпись проверяющего

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

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.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Амирхановой Элены Эдуардовны на тему: «Формирование биопленок штаммами *Pseudomonas* на биологических объектах(корнях растений)»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.
Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения
Тема ВКР актуальна, полученные экспериментальные результаты обладают новизной.

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы.
ВКР выполнена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к квалификационным работам.
В обзоре литературы проведен анализ достаточного объема источников по изучаемой проблеме.
Экспериментальная часть работы выполнена с использованием комплекса современных методов исследований в области микробных объектов. Выводы исследований достоверны и обладают новизной.

4 Технико-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств.
Освоены методы планирования и анализа экспериментальных данных научного исследования
6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач.
Выпускник показал хороший уровень подготовки к выполнению исследовательских задач в области микробиологии.

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.
Работа оформлена в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.

9 Обоснованность выводов и предложений
Выводы работы обоснованы, следуют из полученных результатов.
10 Замечания по усмотрению рецензента (дополнительные замечания представлены на листах приложения) нет
11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.
Результаты ВКР могут быть использованы в учебном процессе и рекомендуются к публикации в профильном журнале.

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени).
Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично».
Выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр.

Рецензент
к.б.н., доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Ю.Л.Борцова

Подпись Борцовой Ю.Л.
удостоверяю.
Начальник управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
«21» июня 21 г.

Ведущий специалист
Управления кадров
Самигуллина А.Р.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Амирхановой Элены Эдуардовны
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Формирование биопленок штаммами Pseudomonas на биологических объектах (корнях растений)»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.
Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике.

4 Технико-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе имеет социально-экономическое значение в микробиологической науке.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств
Освоены методы планирования и анализа

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. -

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. отличный уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.
Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений
Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента Замечаний нет

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.
Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени).
Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично» и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент
ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по научно-производственной работе, профессор, д.б.н.
(Место работы, занимаемая должность)

ФБУН ГНЦ ПМБ ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

А.П. Шепелин

ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401А
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Амирхановой Элены Эдуардовны
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Формирование биопленок штаммами *Pseudomonas* на биологических объектах (корнях растений)

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию
Полностью соотвествует

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).
Тема работы актуальна так как на сегодняшний день ведется поиск новых антибиотиков.

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач Выпускник проявил отличное умение самостоятельно и творчески решать поставленные задачи, практическая и теоретическая подготовленность на отличном уровне, выпускник готов к выполнению профессиональных задач.

4 Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР.
при написании работы использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft PowerPoint, владение программ хорошее

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР.

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствие с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР) студентов выпускных курсов БГМУ

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости).
Работа выполнена в соответствии с требованиями
(дополнительные сведения представлены на _____ листах приложения)

9 Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Автором тема глубоко проработана, и глубоко изучена, заслуживает внимания результаты и обсуждения

10 Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. «Отлично»
Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки хорошо при успешной сдаче
Руководитель выпускной квалификационной работы

Научный руководитель:
Профессор ,д.б.н
Баймиев А.Х.
(Фамилия, имя, отчество, должность) (Подпись)

Подпись Баймиева А.Х. удостоверяю.
Начальник управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
«10» июня 2024 г.
ВЕДУЩИЙ СПЕЦИАЛИСТ
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
САМИГУЛЛИНА А.Р.