

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



Исмагилова Залина Рамилевна

**Формирование биопленок штаммами *Pseudomonas* на инертных
поверхностях**

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
профессор, д.б.н



Ал. Х. Баймиев

Уфа – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биопленки как форма существования бактерий в природе

1.2. Этапы формирования биопленок

1.3. Структурная организация биопленок

1.4. Характеристика бактерий рода *Pseudomonas* и их распространение в природе

1.5 Роль биопленок в природе и инфекционной патологии человека

1.6 Методы борьбы с биопленками

1.7. Методы определения чувствительности к антимикробным препаратам

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

2.2 Оборудование

2.3. Питательные среды для культивирования бактерий

2.4. Определение антибиотикоустойчивости бактерий

2.5. Определение интенсивности биопленкообразования методом связывания красителя

2.6. Статистическая обработка результатов

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Определение антибактериальной устойчивости *Pseudomonas* sp штаммов 102 и 103.

3.2. Подбор оптимальных условий для оценки эффективности биопленкообразования *Pseudomonas* sp штаммов 102 и 103 на инертных поверхностях.

3.3. Изучение влияния ДДС на рост биопленок *Pseudomonas* sp штаммов 102 и 103 на инертных поверхностях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЫВОДЫ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ЭПС – экзополисахариды
ЛПС – липополисахариды
КПС – капсульные полисахариды
NF - Nod – факторы
ПБМ – перибактероидная мембрана
UDP – уридиндифосфат
IMP – инозитолмонофосфатаза
АТЛ – N-ацетил-гомосеринлактон
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ТАЕ – трис-ацетатный буфер
УМ-среда – маннитно-дрожжевая среда
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ПАВ – поверхностно-активное вещество
ДДС-додецилсульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Повсеместно в природе большинство бактерий существует в форме биопленок. Биопленка представляет собой архитектурно сложно организованное сообщество бактерий, прикрепленных к биотической или абиотической поверхности и заключенных во внеклеточный матрикс, продуцируемый самими бактериями, состоящий из полисахаридов, ДНК и белков. В биопленке у бактерий меняются физиологические процессы, осуществляется особая система регуляции экспрессии генов всего сообщества. Полимерный матрикс защищает бактерии от стрессового воздействия окружающей среды, в частности биопленки значительно устойчивее к действию противомикробных препаратов, обеззараживающих средств. Таким образом, существование в форме биопленок дает значительные преимущества в выживании бактериям по сравнению со свободноживущим состоянием [48].

Биопленкообразование вызывает огромный интерес исследователей в последние десятилетия, прежде всего потому, что большая часть бактериальных инфекций протекает с образованием биопленок, что создает значительные сложности при лечении. Также большое значение для сельского хозяйства имеет изучение условий биопленкообразования полезных почвенных бактерий, способных улучшать рост и продуктивность растений [48].

Pseudomonas – грамотрицательные бактерии, повсеместно распространенные в природе. Данные бактерии приспособлены к росту и выживанию в широком диапазоне температур, влажности, кислотности и других факторов среды. В науке псевдомонады являются широко используемым модельным объектом исследования вследствие огромного практического значения для человека. Хорошо известна способность данных бактерий формировать биопленки на различных поверхностях. Так, почвенные Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) псевдомонады

применяются в сельском хозяйстве в качестве ростостимулирующих штаммов, которые образуют биопленки в почве и на корнях растений. В медицинской практике огромную проблему создают псевдомонады, образующие биопленки на поверхности кожи, внутренних органов при различных заболеваниях, а также на инертных поверхностях: катетерах, оборудовании, посуде [7].

Исследование факторов биопленкообразования условно-патогенных PGPR штаммов псевдомонад на инертных поверхностях может помочь расширить наши знания об условиях культивирования и использовании данных бактерий в сельском хозяйстве и также может быть полезным для решения проблемы предотвращения нежелательного биопленкообразования.

Целью исследования являлось изучение условий формирования биопленок почвенными штаммами *Pseudomonas* sp 102 и 103 на инертных поверхностях на примере полистироловых планшетов.

Задачи исследования:

1. Подбор оптимальных условий для оценки эффективности биопленкообразования на поверхности полистироловых планшетов бактериями *Pseudomonas* sp. штаммы 102 и 103.
2. Изучение влияния факторов среды на рост биопленок, образуемых бактериями *Pseudomonas* sp 102 и 103 на поверхности полистироловых планшетов.
3. Микроскопия биопленок, формируемых на поверхности полистироловых планшетов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биопленки как форма существования бактерий в природе

Биопленки представляют собой сообщества микробных клеток, которые сгруппированы в микроколонии, окруженные защитным матриксом [12]. В этом состоянии бактериальные клетки очень устойчивы к стрессам, включая антибактериальное лечение и дезинфекцию [7].

Биопленки неуязвимы к экстремальным условиям окружающей среды и могут защитить входящие в них микроорганизмы от ультрафиолетового (УФ) излучения, экстремальных температур, экстремального pH, высокого давления, повысить выживаемость на средах с низким содержанием питательных веществ, действуя при этом как «защитная одежда» [58]. Они образуются на постоянных катетерах, эндоскопах, внутренних имплантатах, контактных линзах и протезах [26].

Актуальнейшей проблемой мирового масштаба в медицине в настоящее время считается устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам, что в свою очередь вызывает высокий уровень заболеваемости и смертности [9]. Благодаря биопленкам, бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам, и уклоняются от воздействия иммунной системы. Поэтому в последние годы исследования биопленок были в основном сосредоточены на устойчивости к антибиотикам [8]. Изучение биопленок в настоящее время вызывает огромный интерес исследователей, в связи с тем, что этот способ существования бактерий создает большие проблемы в медицинской практике [49]. Подсчитано, что около 80% бактерий вызывающих хронические инфекции, могут образовывать биопленки [49].

В естественных условиях микроорганизмы могут существовать либо в виде планктонных (свободно плавающих) культур, либо в виде биопленок [2].

По современным представлениям 95-99% микроорганизмов в природных местах обитания существуют в виде биопленок. Биопленки

покрывают абиотические поверхности, органы и ткани живых организмов. В природе бактерии, как правило, существуют в виде сложных сообществ, состоящих из представителей разных видов [29]. Сообщества микроорганизмов способны реализовывать нормальные метаболические циклы в природных условиях. Например, плотные биопленки – бактериальные маты – образуются на стенах пещер, на поверхности минеральных отложений и вокруг горячих источников. Хорошо изучены маты фотосинтезирующих, метаногенных и сульфатредуцирующих бактериальных сообществ, а также сообщество микроорганизмов, развивающееся в очистных сооружениях сточных вод. Этот тип биопленок часто может достигать в толщину нескольких десятков сантиметров (рис.1) [28].



Рисунок 1- Биоплёнка в очистных сооружениях сточных вод (Bhiwadi, Rajasthan., 2014).

Особо важным в таком случае является способность к координации метаболизма во всем сообществе за счет специфичных соединений-мессенджеров [14]. Также биопленка хорошо связывает воду – обязательный компонент большинства метаболических путей с вовлечением неорганических соединений [25].

В биотехнологии обрастание микроорганизмами абиотических поверхностей считается явлением крайне нежелательным. Очистка биореакторов, турбин и фильтров от биопленок требует существенных затрат, и, к сожалению, не всегда эффективна. Образование биопленок на оборудовании зачастую приводит к контаминации сред нежелательной микрофлорой, низкой эффективности биотехнологических систем, коррозии и порче оборудования [17].

Микроорганизмы ризосферы и ризопланы образуют биопленки на поверхности корней и корешков растений (рис.2).

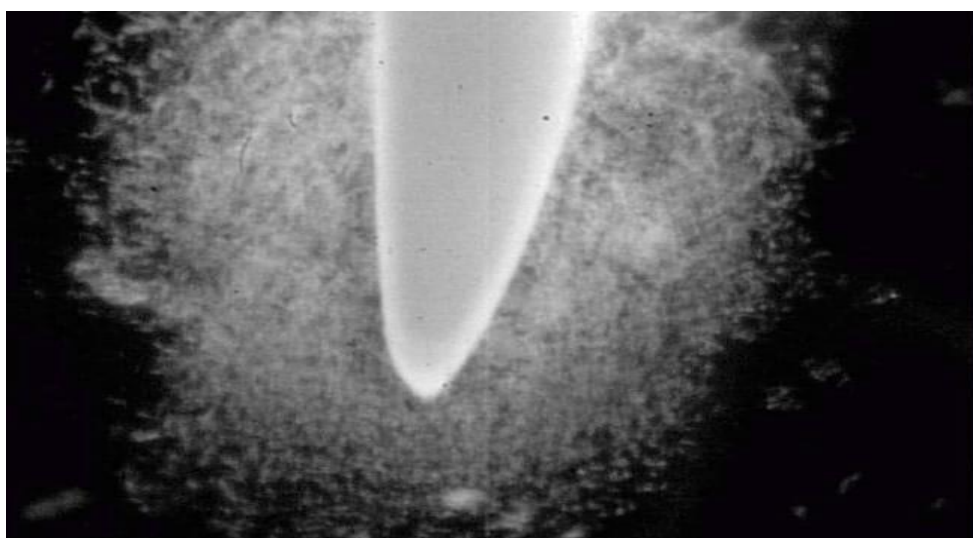


Рисунок 2 - Биоплёнка на поверхности корня (Rodney M. Donlan, 2015).

Эти микроорганизмы способны стимулировать рост растений, выделяя огромное количество различных биологически активных соединений, а также способны защищать растения от патогенной микрофлоры почв [23].

В организме человека представители нормальной микрофлоры образуют биопленки на поверхности различных органов и тканей. В форме биопленок существует резидентная микрофлора слизистых полости рта, кишечника и кожи человека. Например, очень хорошо изучены зубные биопленки (бляшки), образованные сложным сообществом многих микроорганизмов (рис.3). [14].

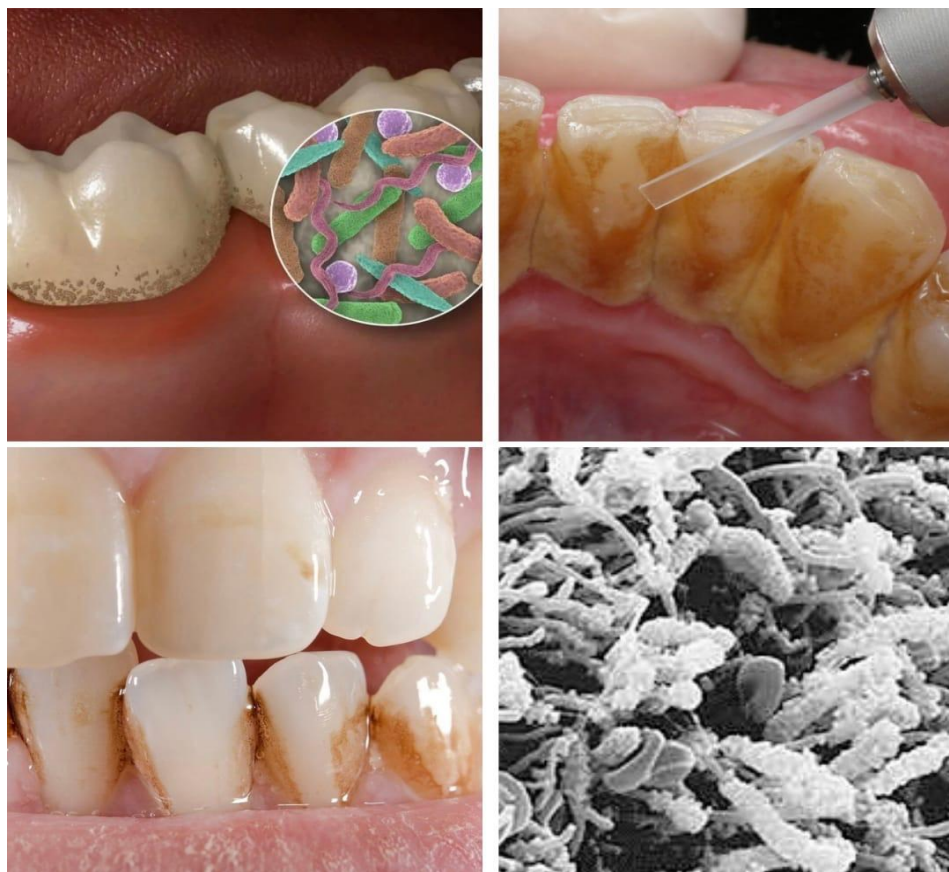


Рисунок 3 – Зубные бляшки (<https://intan.ru/entsiklopediya/И/>)

Для зубных бляшек описана строгая последовательность колонизации разными микроорганизмами, типы и механизмы взаимодействия организмов. Из зубных биопленок выделены сотни видов микроорганизмов [22].

Сформированные сообщества микроорганизмов нормальной микробиоты человека защищают организм от вторжения и развития сторонней и патогенной микрофлоры [20]. Однако бактериальные биопленки имеют серьезное значение в клинической медицине. При ослаблении иммунной системы в ходе некоего заболевания и осуществлении медицинского вмешательства в организм человека может произойти возникновение вторичных инфекций (т.е. сопутствующих), вызванных бактериями из окружающей среды или нормальной микрофлоры человека [18].

1.2 Этапы формирования биопленок

Развитие биопленок проходит ряд этапов (рис.4). На первом этапе происходит адгезия микроорганизмов к поверхности субстрата из внешней среды (чаще всего жидкой среды). Эта стадия обратима, так как адгезировавшиеся клетки могут вернуться к планктонной форме существования [33].

Второй этап заключается в окончательном прикреплении клеток к поверхности и называется фиксацией. На этой стадии микробы выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочную адгезию [19].

На третьем этапе образуются микроколонии - отдельные скопления адгезированных клеток. На этой стадии клетки активно делятся, а выделяемый матрикс удерживает вместе всю колонию. И, наконец, микроколонии сливаются, и образуется зрелая биопленка, имеющая сложную трехмерную структуру. Она может изменять свой размер и форму. Внеклеточный матрикс защищает ее от внешних угроз. Также для многих бактерий с развитой подвижностью выделяют стадию клеточного монослоя. [42]. В данном случае клетки способны распространяться вдоль подложки, используя различные поверхностные элементы клеток (пили, фимбрии) и образуя швермеры – удлинённые клетки с несколькими хромосомами. Также, особенно при низком содержании питательных веществ, клетки способны покидать биопленку и переходить в планктонную форму, что называется дисперсией (выброс бактерий) [19].

В результате дисперсии от биопленки периодически отрываются отдельные клетки, способные через некоторое время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию. Внутри зрелых биопленок выделяют популяцию персистеров – клеток с особой устойчивостью к антибиотикам [60].

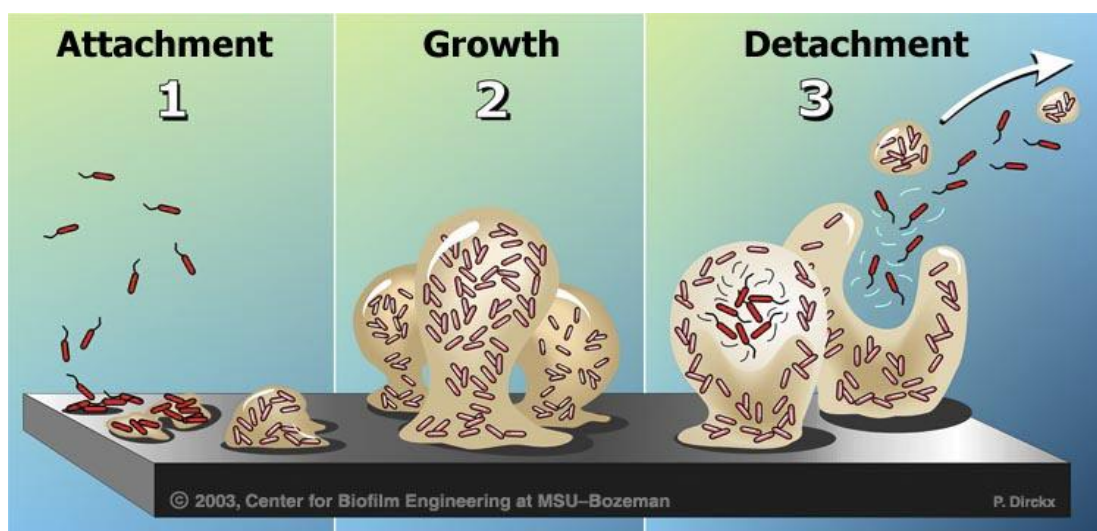


Рисунок 4 – Стадии формирования биопленок (D. Lebeaux et al., 2014)

1.3 Структурная организация биопленок

Биопленки - это структурированный консорциум бактерий, встроенных в полимерную матрицу собственного производства, состоящую из полисахарида, белка и ДНК [60].

Полимерные вещества называют матриксом или внеклеточной полимерной субстанцией (EPS). Матрикс высоко гидратирован на 97% состоит из связанной воды. По своей организации имеет пористую структуру, пропускающую низкомолекулярные соединения, но задерживающую крупные молекулы и частицы среды [20].

Основными компонентами матрикса являются полисахариды, белки и ДНК (рис.5). Состав матрикса может варьироваться в зависимости от условий среды. Например, в уринальных катетерах на поверхности биопленок нередко наблюдается накопление неорганических соединений кальция, магния и фосфатов с образованием кристаллинов [51].

Наиболее важным условием появления зрелой биопленки является продукция экзополисахаридов (полисахариды). Некоторые исследователи считают наличие полисахаридного компонента обязательным для всех

биофленок. Сахара могут различаться по своей структуре, по большей части, представлены бета-1,6-N-ацетил-D-глюкозамином и целлюлозой [53]. Экзополисахариды могут составлять до 80% от всего матрикса биофленки [54].

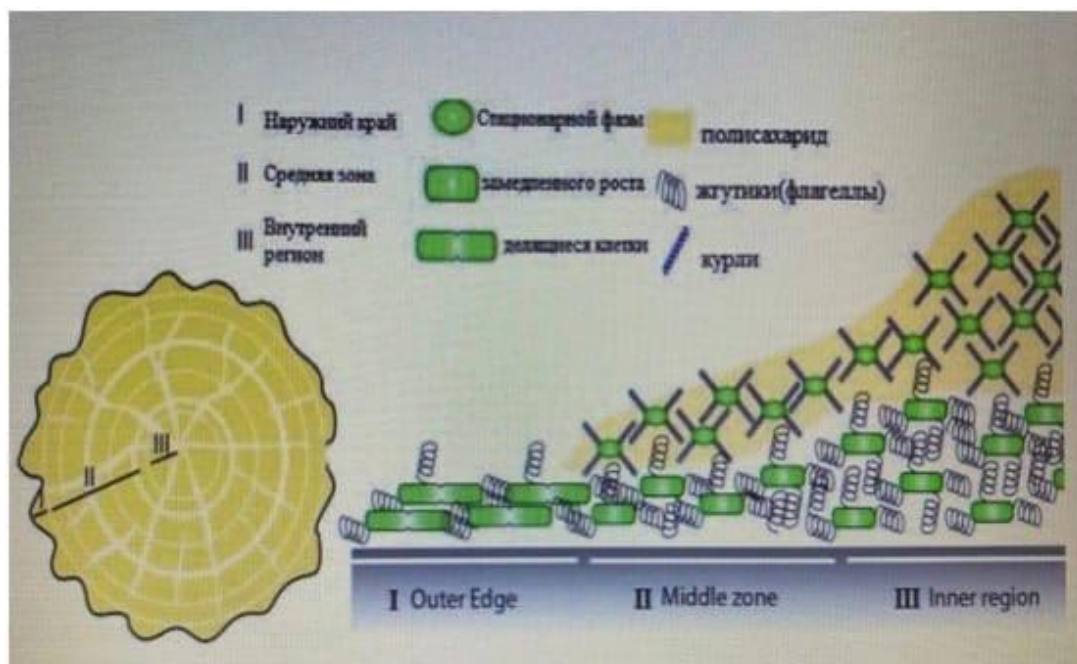


Рисунок 5 – Структурная организация биофленки (Hobley et al., 2015).

Белки составляют до 30-40% от общего объема матрикса биофленок. Доказано, что основная часть белков во многих биофленках представлена амилоидоподобными белками: курли (curli) волокна (CsgA/CsgB белки) у грамотрицательных бактерий и TasA/TapA-белки у бацилл [37]. Амилоидоподобные структуры бактерий привлекают внимание исследователей как компоненты биофленочных матриксов бактерий для изучения инфекционных амилоидов, ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями, такими как, болезнь Альцгеймера и Паркинсона [59]. Амилоидные группы в составе белка определяют высокую термостабильность, а также его адгезивную способность [12].

Внеклеточная ДНК способна экскретироваться путем везикулярного транспорта, однако основным способом ее выделения в матрикс является

лизис клеток. Эта ДНК участвует в горизонтальном переносе генов в пленках и передаче сигналов между клетками. Также, внеклеточная ДНК может играть структурную роль и служить мишенью для экзонуклеаз [57].

Характерно, что градиенты питательных веществ и кислорода существуют от верха к низу биопленок, и эти градиенты связаны со снижением метаболической активности бактерий и увеличением времени удвоения бактериальных клеток; именно эти более или менее спящие клетки ответственны за некоторую толерантность к антибиотикам [24].

Рост биопленок связан с повышенным уровнем мутаций, а также с механизмами, регулируемые кворумом. Обычные механизмы устойчивости, такие как хромосомная бета-лактамаза, повышенная регуляция насосов оттока и мутации в молекулах-мишенях антибиотиков у бактерий, также способствуют выживанию биопленок [4].

1.4 Характеристика бактерий рода *Pseudomonas* и их распространение в природе

Псевдомонады являются грамотрицательными, условно патогенными бактериями из семейства *Pseudomonadaceae*, способными продуцировать различные флуоресцентные и нефлуоресцентные пигменты и передвигаться с помощью полярных жгутиков [16]. Грамотрицательные бактерии – бактерии, которые в отличие от грамположительных бактерий не окрашиваются кристаллическим фиолетовым при окрашивании по Граму, из-за особенности строения клеточной стенки [5].

У грамотрицательных бактерий очень тонкая клеточная стенка, содержащая меньше муреина, чем у грамположительных бактерий [5]. Стенка защищена внешней мембраной от проникновения различных соединений, что так же делает их устойчивым к антителам [6].

Наружная мембрана - это первый слой клеточной оболочки грамотрицательных бактерий. Этот фрагмент клеточной оболочки состоит из

фосфолипидов во внутренней части и в основном из липополисахаридов во внешней части [61]. Липополисахарид (ЛПС, эндотоксин) - термостабильный компонент, состоящий из трех частей, различающихся по химической структуре и биологической активности: липид А, сердцевинный олигосахарид и дистальный полисахарид (О-антиген) (рис.6). ЛПС вносит большой вклад в структурную целостность бактерий и защищает их от атаки иммунной системы хозяина [15].

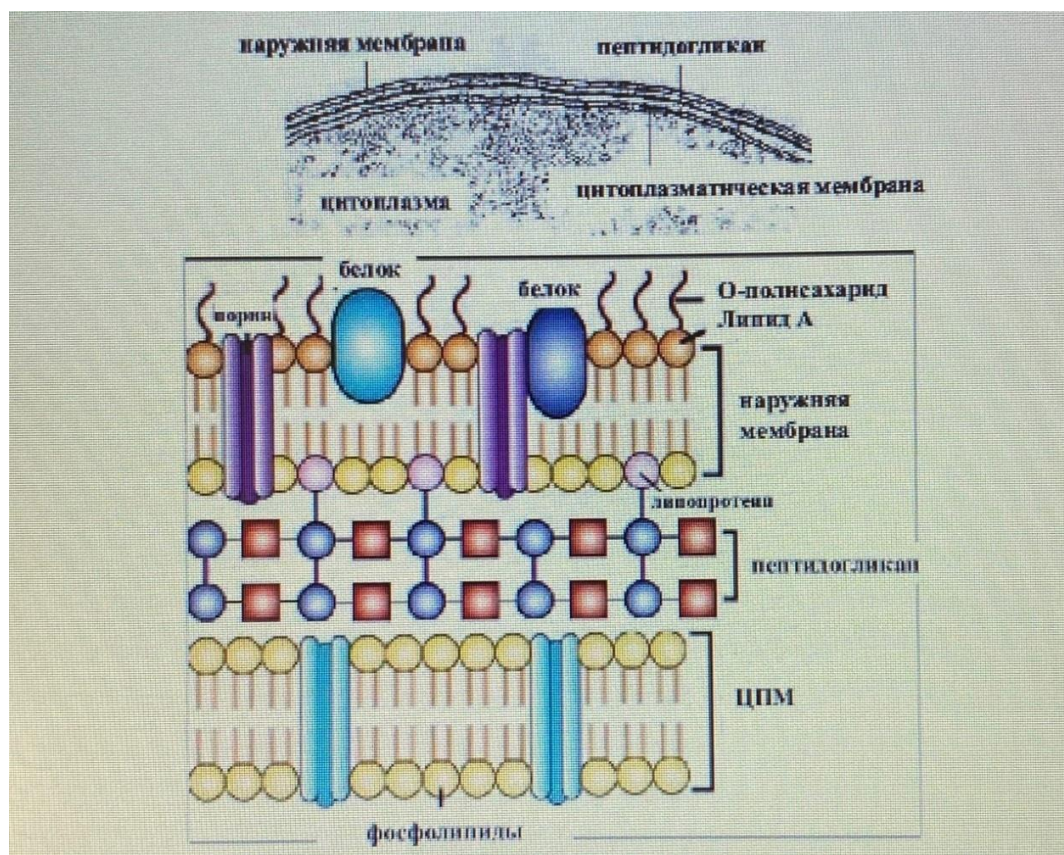


Рисунок 6 – Клеточная стенка грамотрицательных бактерий (<https://slide-share.ru/kletochnaya-stenka-prokariot-104521>).

Pseudomonas fluorescens, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fragi* являются наиболее часто встречающимися видами в природе, однако распределение видов в пищевой экосистеме остается относительно малоизученным [13].

Основная микробная популяция у овощных культур в полевых условиях состоит из видов рода *Pseudomonas*, в особенности много среди них

бактерий, обладающих флуоресцентными пигментами [13]. Иногда культуры бактерий рода *Pseudomonas* утрачивают способность синтезировать пигмент. Например, некоторые бактерии *Pseudomonas aeruginosa* могут временно или совсем утратить пигментацию [13]. Известны и беспигментные штаммы этого вида [13]. Во время хранения и обработки культур их число возрастает, а при минимальной обработке овощей они играют важную роль в процессе потемнения плодов благодаря их пектинолитической активности [13].

Рыбные продукты служат хорошим субстратом для размножения бактерий рода *Pseudomonas*, особенно в условиях аэробного хранения во льду. Действительно, бактерии данного рода считаются одними из главных продуцентов летучих соединений, придающих продуктам неприятный запах (альдегидов, кетонов и сложных эфиров) [11].

Бактерии *Pseudomonas* sp. также играют важную роль в процессе ферментативной порчи молока. Во время хранения сырого молока они производят много термоустойчивых липолитических и протеолитических ферментов, которые приводят к снижению качества и срока годности переработанного молока [6].

Полезные микроорганизмы, ассоциированные с корнями растений, облегчают абиотический стресс у различных сельскохозяйственных культур [40]. Бактерии, способствующие росту растений расположены в ризосфере или корневой поверхности растения, именно они могут увеличивать рост и урожайность растений [41]. Некоторые из известных механизмов, с помощью которых PGPR могут быть полезны для растений, включают в себя: восстановление почв, загрязненных тяжелыми металлами, путем связывания токсичных видов тяжелых металлов и разложения ксенобиотических соединений, а также улучшение структуры почвы (за счет бактериальных экзополисахаридов) [44].

Уже много лет назад исследователи интересовались использованием PGPR для увеличения роста и урожайности растений. Однако роль этих полезных бактерий в управлении абиотическими стрессами приобретает все

большее значение в последние годы [40]. В настоящее время несколько исследований подтверждают гипотезу о том, что PGPR позволяют сельскохозяйственным растениям поддерживать продуктивность [41]. PGPR продуцируют регуляторы роста растений, фитогормоны и различные вторичные метаболиты, которые вызывают рост и развитие растений [32].

1.5 Роль биопленок в природе и инфекционной патологии человека

К настоящему времени накопилось значительное количество данных о том, что микроорганизмы в составе биоплёнки влияют на течение хронических воспалительных заболеваний. Биопленки обладают высоким уровнем толерантности к антителам, антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и фагоцитам [1]. К сожалению, стандартные методы антибактериального лечения направлены на отдельно существующие планктонные клетки, тогда как бактерии внутри биоплёнки размножаются и вновь диссеминируют после завершения курса лечения, нередко формируя очаги хронической персистирующей инфекции, способствуя рецидивированию заболевания [50].

Показано, что бактерии в биопленках могут обмениваться плазмидами, содержащие гены, ответственные за резистентность к антибиотикам [44]. Физическая близость клеток в биопленках облегчает обмен плазмидами по тому же механизму, что и среди планктонных микроорганизмов. Показано что обмен плазмидами между разными видами *Pseudomonas* были значительно выше в биопленках, чем для тех же микроорганизмов во взвешенной культуре. Появление резистентных микроорганизмов особенно опасно в случае их роста и размножения в условиях стационара, поскольку они способны распространяться от пациента к пациенту через руки медперсонала [52].

Сейчас не вызывает сомнений необходимость пересмотра концепции патогенеза различных хронических инфекций, используя имеющиеся данные

о биопленках. В практическом отношении это требует внедрения новых методов диагностики и лечения [39].

1.6 Методы борьбы с биопленками

За последние годы накоплено много данных по борьбе с биоплёнками, которые дают положительные результаты, что позволяет снизить частоту развития осложнений воспалительных заболеваний [1].

Исследования показали, что микроорганизмы в составе биоплёнок выявляют при рецидивирующих инфекционно-воспалительных заболеваниях, а так же они влияют на течение хронических воспалительных процессов организма [31].

К числу заболеваний, связанных с присутствием биоплёнок, относят мочекаменную болезнь, хронический простатит, инфекции мочевых путей, муковисцидоз, инфекции кровотока, хронический остеомиелит, стоматологические проблемы (зубной камень, кариес, гингивит), хроническую обструктивную болезнь лёгких (ХОБЛ), хронический синусит и т.д. (рис. 7.) [55].

Для идентификации микроорганизмов в составе биоплёнок используют молекулярные методы диагностики, такие как: электрофорез, ПЦР, секвенирование [38].

Для борьбы с биопленками, образующимися при различных заболеваниях, применяют различные методы. Образование биопленок можно предотвратить ранней агрессивной профилактикой или терапией антибиотиками, также с ними борются хронической супрессивной терапией [47].

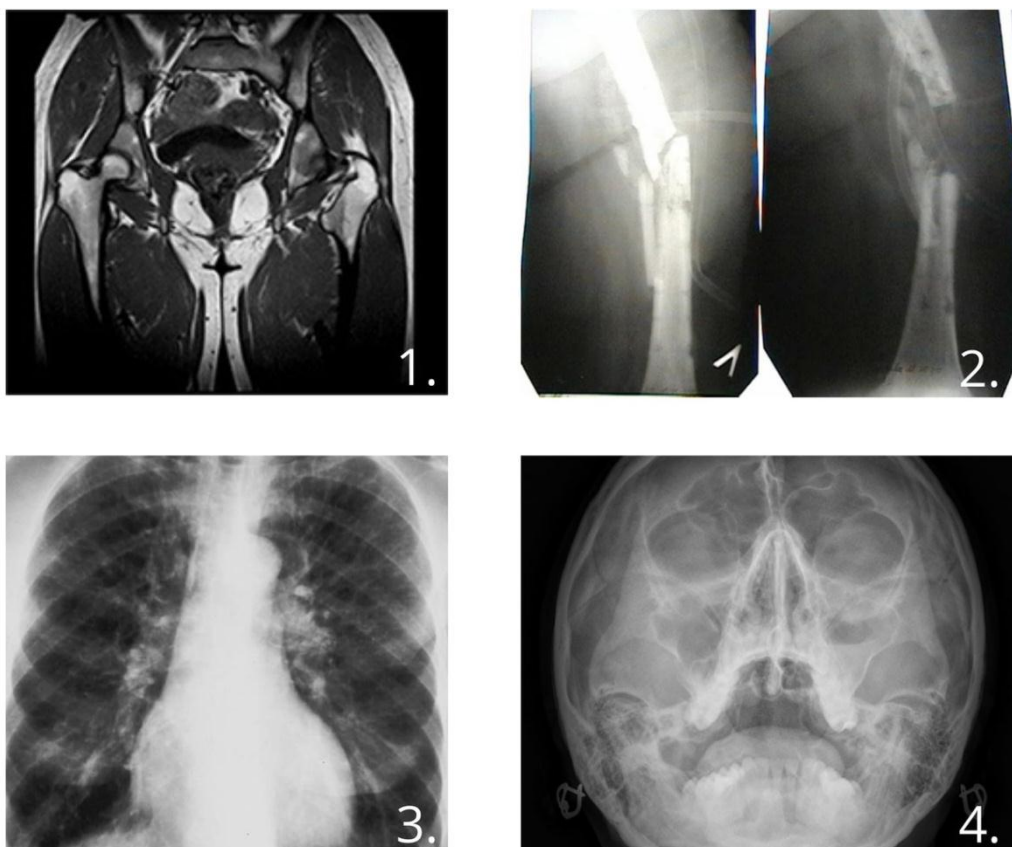


Рисунок 7 – (1. Хронический простатит, 2. Хронический остеомиелит, 3. ХОБЛ, 4. Хронический синусит).

В тоже время известно, что рост микроорганизмов в биопленках может повысить их устойчивость к антимикробным агентам. Как следствие, антимикробная терапия часто не может уничтожить биопленки в очаге инфекции. По этой причине необходимы инновационные противобиопленочные агенты с новыми мишенями и способами действия [27].

Среди методов борьбы с биопленками выявлена новая мишень – внеклеточная ДНК матрикса биопленок для воздействия на бактерии с целью повышения эффективности антибиотикотерапии. Использование ДНК матрикса, как дополнительной мишени при терапии, позволяет повысить эффективность действия различных антибиотиков на неродственные микробы, находящиеся в биопленках, снизить вероятность возникновения, распространения и сохранения устойчивости к лечебному агенту, сократить

общую продолжительность терапии, уменьшить сроки пребывания больных в стационаре и снизить частоту рецидивов заболевания [28].

Перспективной стратегией для борьбы с биопленкообразованием может быть использование ферментов, которые способны растворять матрикс биопленки (например, ДНК-азы и альгинатлиазы), а также применение ингибиторов кворум-чувствительности, которые повышают чувствительность биопленок к антибиотикам [47].

Большое количество лабораторий в настоящее время пытается выявить гены, которые экспрессируются или наоборот репрессируются во время начального формирования биопленок, что также может служить отправной точкой для появления диагностических тестов или выработки стратегии подавления биопленок на генном уровне [45]. Исследователи изучили способность штаммов *Mycobacterium smegmatis* (быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий) без генов *rpf* образовывать биопленки и тестировали их восприимчивость к агентам, нацеленным на клеточные стенки. *M. smegmatis* кодирует четыре различных гомолога *rpf*, а именно MSMEG_5700 (*rpfA*), MSMEG_5439 (*rpfB*), MSMEG_4640 (*rpfE2*) и MSMEG_4643 (*rpfE*). В результате удаления генов *rpf* наблюдались изменения морфологии колоний и невозможность образования типичных биопленок. Более того, у штаммов, не имеющих *rpfA* и *rpfB*, одновременно наблюдалась повышенная восприимчивость к рифампицину, ванкомицину и SDS [46]. Таким образом, исследователи продемонстрировали, что прогрессивное удаление генов *rpf* препятствует развитию биопленок и снижению толерантности к лекарственным средствам. Все это сопровождалось снижением продуцирования муропептида и изменением пептидогликанового сшивания. В совокупности эти наблюдения указывают на важную роль генов в микобактериальной коммуникации и лекарственной толерантности [45].

Было проведено исследование на модели *in vitro* сочетанного действия лактоферрина и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс

формирования биоплёнок *P. aeruginosa*, являющимися возбудителями оппортунистических инфекций. Эффект воздействия лактоферрина и ципрофлоксацина заключается в том, что при использовании низких концентраций антибиотика интенсивность процесса формирования биоплёнок клетками культуры *P. aeruginosa* значительно уменьшается и может оказаться эффективной альтернативой для лечения иммунодефицитных больных с целью предотвращения возникновения хронических очагов инфекции [36].

Еще одним перспективным направлением борьбы с микробными биопленками является клиническое использование бактериофагов, которые помимо непосредственного литического действия индуцируют продукцию деполимераз в микробных биопленках [3]. Установлено, что положительный клинический результат после аэрозольного применения антисинегнойного бактериофага больным муковисцидозом связанный с эффектом активной деградации экзополисахаридного компонента биопленочного матрикса, который возникает при проникновении бактериофагов во внутренние слои микробной биопленки [2].

Многие из известных способов борьбы с биопленками непригодны для применения в медицине, так как могут нанести вред медицинским устройствам или непосредственно организму больного. Однако поиски продолжается, и несколько вариантов могут послужить базой для дальнейших исследований [2].

1.7 Методы определения чувствительности к антимикробным препаратам

Цель определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам является прогнозирование их эффективности при лечении пациентов. На сегодняшний день теоретически наиболее обоснованным представляется комплекс подходов к оценке чувствительности и интерпретации результатов, предлагаемый European Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). К антибиотикам EUCAST можно отнести вещества природного, полусинтетического или синтетического происхождения, которые проявляют активность к бактериям, применяются и для лечения инфекционных болезней [27].

Современные методы определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам разделяют на методы серийных разведений и диффузионные. Метод серийного разведения заключается в том, что он основан на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность АБП – величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК) видимого роста исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на твердой среде. Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемых микроорганизмов в той зоне, где концентрация АБП выше МПК. На сегодняшний день существуют два диффузионных метода: диско-диффузионный и Е-тест (Клин микробиал антимикроб химиотер [27].

Самый распространенный метод определения чувствительности бактерий к антибиотикам среди всех является диско-диффузионный метод (ДДМ). Преимуществом ДДМ является низкая стоимость, высокая воспроизводимость результатов [34].

При определении чувствительности ДДМ в чашку Петри с агаром наносят бактериальную суспензию микроорганизма, затем помещают диски с антибиотиками. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков [52].

Результат учитывают по величине диаметра зоны подавления роста вокруг диска, измеряется в миллиметрах. Зоны подавления роста возбудителя вокруг дисков с антибиотиками тестируемые штаммы делят на чувствительные, умеренно-резистентные и резистентные. Для того чтобы определить к какой чувствительности относятся между собой, используют

пограничные значения диаметров зон подавления роста микроорганизмов. Пограничные значения не являются неизменными величинами [34].

Существуют два подхода к интерпретации результатов определения чувствительности: микробиологический и клинически [12].

Микробиологическая интерпретация основана на анализе распределения значений концентрации антибиотика, подавляющей жизнеспособность микроорганизмов. Основой клинической интерпретации является эффект от антибактериальной терапии. К чувствительным относят микроорганизмы, если при лечении стандартными дозами антибиотика инфекций, вызванных этими бактериями, наблюдается терапевтический эффект [19].

При микробиологической интерпретации к резистентным относят бактерии, которые имеют приобретенные механизмы резистентности. Клиническая резистентность происходит в том случае, если нет эффекта от антибактериальной терапии. К микроорганизмам с промежуточной резистентностью относят субпопуляцию, которые находятся в соответствии со значениями МПК между чувствительными и резистентными бактериями [12].

Е-тест представляет собой узкую полоску полимера, на которую наносится градиент концентраций АБП. Подавление роста бактерий вокруг полоски Е-теста только в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из носителя, выше МПК. Значения концентрации АБП в каждом участке носителя типографским способом наносится на наружной поверхности Е-теста. Величину МПК учитывают в том месте, где зона подавления роста плотно подходит к носителю [27].

ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов были использованы штаммы *Pseudomonas* sp. 102 и 103 из коллекции клубеньковых и ризосферных бактерий “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН, выделенные из клубеньков дикорастущих бобовых растений Южного Урала. Клубеньковые бактерии культивировали на жидких и агаризованных средах Мюллера-Хинтона (М-Н), YM, LB и TY при оптимальной температуре 28°C.

2.2 Оборудование

Микроскопия - универсальный флуоресцентный микроскоп Axio Imager.M1 (оба - CarlZeiss, Германия), универсальный флуоресцентный микроскоп модели Biozero серии BZ-8100 (Keyence, Япония).

Центрифугирование – напольная ультрацентрифуга Optima L-90K (Beckman-Coulter, США). Напольные скоростные центрифуги моделей Avanti J-30i и Avanti J-E (Beckman-Coulter, США), настольные лабораторные центрифуги моделей 5804R фирмы Eppendorf, модели UNIVERSAL 32R фирмы Hettich, модели Multifuge 1 S-R фирмы ThermoElectron-Heraeus (все - Германия), многочисленные микроцентрифуги производства разных фирм, разных стран, в том числе рефрижераторные производства Heraeus/Kendro, Eppendorf, Hitachi;

Для различных измерений и анализов - спектрофотометр SmartSpecPlus (оба - Bio-RadLaboratories, США), спектрофотометр NanoDrop 1000 (Thermo, США), планшетный анализатор EnSpire (PerkinElmer, США),

Вспомогательное оборудование – система очистки воды 18 мОм Milli Q Academic (Millipore, США), многочисленные низкотемпературные холодильники -85С различных моделей фирм Sanyo (Япония) и Daigei (Дания). Генератор чешуйчатого льда AF80 (Scotsman, Италия), автоклавы

горизонтальные электронные модели ЕКА2350 (Tuttnauer, Израиль), электропораторы MicroPulser и GenePulser X CellTotalSystem, различные электронные весы разных фирм, ламинарные боксы различных типов, включая ПЦР-боксы; и другое лабораторное оборудование.

2.3 Питательные среды для культивирования бактерий

Для культивирования бактерий использовали такие среды как: LB, агаризованная LB, TY, YM, M-H, агаризованная M-H, составы этих сред показаны в таблице №1.

Таблица №1

Составы бактериальных сред

среда LB	На 100 мл среды: бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0.5%), NaCl (1%)
агаризованная среда LB	На 100 мл среды: бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0.5%), NaCl (1%), агар-агар (1.5%)
среда TY	На 100 мл среды: бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,1%), CaCl ₂ (0,1%)
среда YM	На 100 мл среды: маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), MgSO ₄ (0,01%), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (0,05%)
среда M-H	На 100 мл среды: Кислый казеиновый пептон 1,75, вытяжка из говядины 0,2, крахмал 0,15
агаризованная среда M-H	На 100 мл среды: Кислый казеиновый пептон 1,75, вытяжка из говядины 0,2, крахмал 0,15, агар-агар 1,7

2.4 Определение антибиотикоустойчивости бактерий

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли на агаризованной среде М-Н с помощью дисков (HIMEDIA, Индия). Бактерии выращивали в жидкой среде М-Н, на чашке растирали 100 мкл жидкой культуры бактерий. Чашки с дисками выдерживали сутки при 28°C, после чего определяли диаметр отсутствия зоны роста. Были тестированы диски: Am (10 мкг/диск), Tc (30 мкг/диск), Gm (10 мкг/диск).

2.5 Определение интенсивности биопленкообразования методом связывания красителя

Для получения биопленок использовали среды LB, TY, YM, М-Н с применением 24-луночных пластиковых планшетов (полистерол) (CorningInc., США). Для этого исходные штаммы *Pseudomonas* выращивали 48 часов в жидкой среде на качалке при 28°C и 140 об./мин до концентрации 10^8 - 10^9 КОЕ/мл. Затем культуру разводили свежей средой до 10^6 КОЕ/мл и переносили по 1 мл в лунки 24-луночного пластикового планшета. На данном этапе также добавляли ДДС (0-0.1% об.) в экспериментах по влиянию ДДС на толщину биопленок. Для достоверного обсчета результатов, использовали не менее 4-5 лунок на один опытный образец. Дополнительно засевали несколько лунок чистой средой как негативным контролем. Планшеты герметизировали Parafilm (“Amcor”, США), помещали в термостат в горизонтальном положении на ровную поверхность и инкубировали при температуре 28°C и 50 об./мин в течение 7 сут. После культивирования из лунок удаляли среду с планктонными клетками. Для удаления оставшихся планктонных клеток лунки с биопленками промывали в течение 2-3 минут 1М фосфатносолевым буфером (PBS, pH 6,5) в том же объеме, в котором проходило культивирование. В лунки вносили 1-4 мл отфильтрованного 0,1% водного раствора генциан фиолетового (“Агат-Мед”, Россия). Инкубировали

био пленки с красителем в течение 10 минут при комнатной температуре и осторожно промывали водой. Планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу и высушивали. Биопленки микроскопировали с помощью универсального флуоресцентного микроскопа модели Biozero серии BZ-8100 (Keyence, Япония). Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в этаноле и измеряли оптическую плотность при длине волны 590 нм (O'Toole, Kolter, 1998). Оптическую плотность образцов измеряли с помощью прибора Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader ("PerkinElmer", США).

2.6 Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводили в 4-кратной биологической повторности и каждый независимо воспроизводили не менее 3 раз. На диаграммах приведены средние величины и их стандартные ошибки. Достоверность различий при $P \leq 0.05$ определяли с использованием дисперсионного анализа.

ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение антибиотикоустойчивости *Pseudomonas* sp шт. 102 и 103

Из коллекции почвенных микроорганизмов «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН в качестве объектов исследования были взяты штаммы бактерий 102 и 103, выделенные из клубеньков бобовых растений Южного Урала. Ранее по результатам ПЦР и секвенированию 16S РНК данные штаммы бактерий были отнесены к *Pseudomonas* sp.

Далее с помощью диско-диффузионного метода была определена антибактериальная устойчивость шт. 102 и 103 *Pseudomonas* sp. к антибиотикам Am, Tc, Gm (рис. 8). Результаты показаны в таблице № 2.

Вид антибиотика	Диаметр зон подавления роста (см.)	
	102	103
<i>Ampicillinum</i>	-	-
<i>Tetracyclinum</i>	1.5	1.7
<i>Gentamycinum</i>	3	2.7

Таблица №2 -Антибактериальная устойчивость *Pseudomonas* sp шт. 102 и 103. «-»-отсутствие чувствительности к антибиотику.

Полученные данные показали, что наиболее чувствительны данные штаммы оказались к Gm. Наибольшая устойчивость была выявлена к Am.

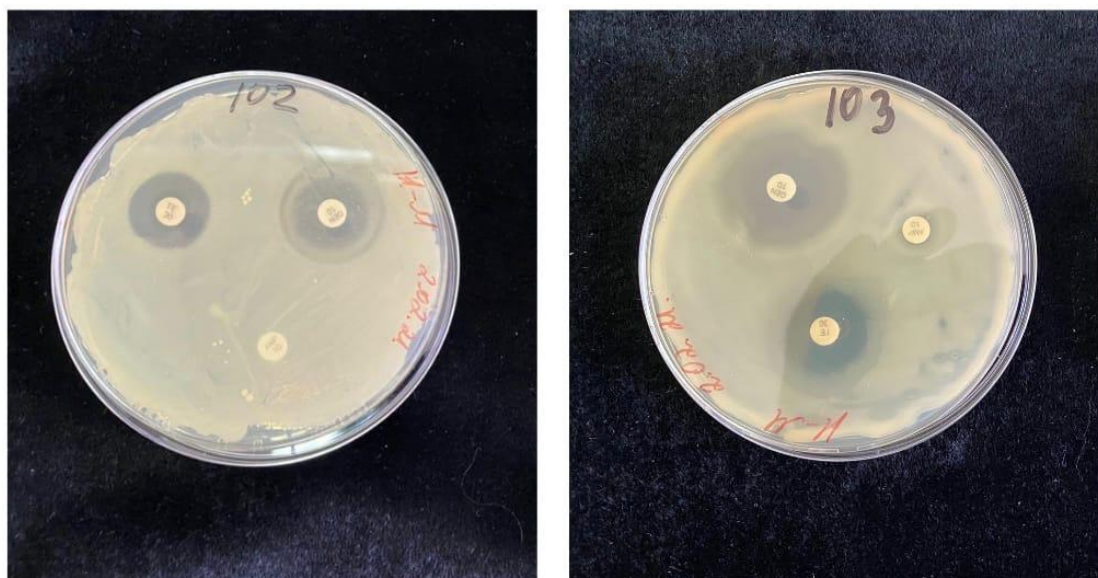


Рисунок 8 – Определение антибактериальной устойчивости *Pseudomonas* sp шт. 102 и 103.

3.2 Подбор оптимальных условий для оценки эффективности биопленкообразования *Pseudomonas* sp шт. 102 и 103 на инертных поверхностях

Была изучена эффективность образования биопленок штаммами 102 и 103 *Pseudomonas* sp. на инертных поверхностях: 48, 96 луночных планшетах на различных питательных средах.

Для формирования биопленок использовались жидкие питательные белковые среды Н-М, LB и углеводная, безбелковая среда УМ. Проведенные исследования показали, что оба штамма псевдомонад способны образовывать биопленки на инертных поверхностях во всех средах (рис. 9). При этом наиболее эффективно биопленки формировались в среде Н-М, содержащей большое количество питательных веществ. Толщина биопленки при культивировании на среде Н-М превышала соответствующие показатели на среде LB и УМ более чем в 1.5 и 1.3 раза, соответственно (рис.10). Однако, оба штамма показали хорошее биопленкообразование и на бедной

питательными веществами среде YM. Так, толщина биопленки обоих штаммов при культивировании на среде YM превышала соответствующие показатели на среде LB в 1.1 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о способности исследованных штаммов псевдомонад формировать зрелые биопленки в условиях, как богатых, так и бедных питательных сред.

Проведенные исследования показали зависимость биопленкообразования от температурных условий. Как контрольные, так и трансформированные бактерии эффективно образовывали биопленки при температуре 28 °С. При культивировании при более низкой температуре способность штаммов формировать биопленки снижалась в более чем 2 два раза. При повышении температуры до 37 °С статистически значимых различий в эффективности формирования биопленок по сравнению со штаммами, выращенными при 28 °С, найдено не было (рис.11).

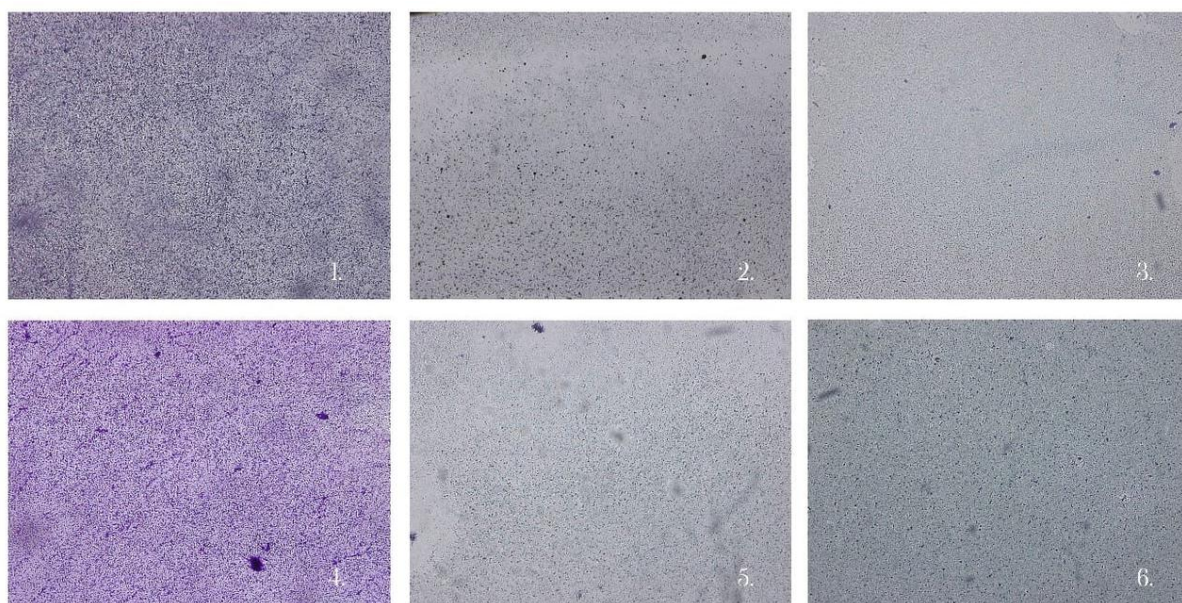


Рисунок 9 – Биопленки, образуемые штаммами 102 и 103 *Pseudomonas* sp. на поверхности планшета через 7 дней культивирования (1. шт.102, среда Н-М; 2. шт.102, среда LB; 3. шт. 102, среда YM; 4. шт. 103, среда Н-М; 5. шт.103, среда LB; 6. шт. 103, среда YM).

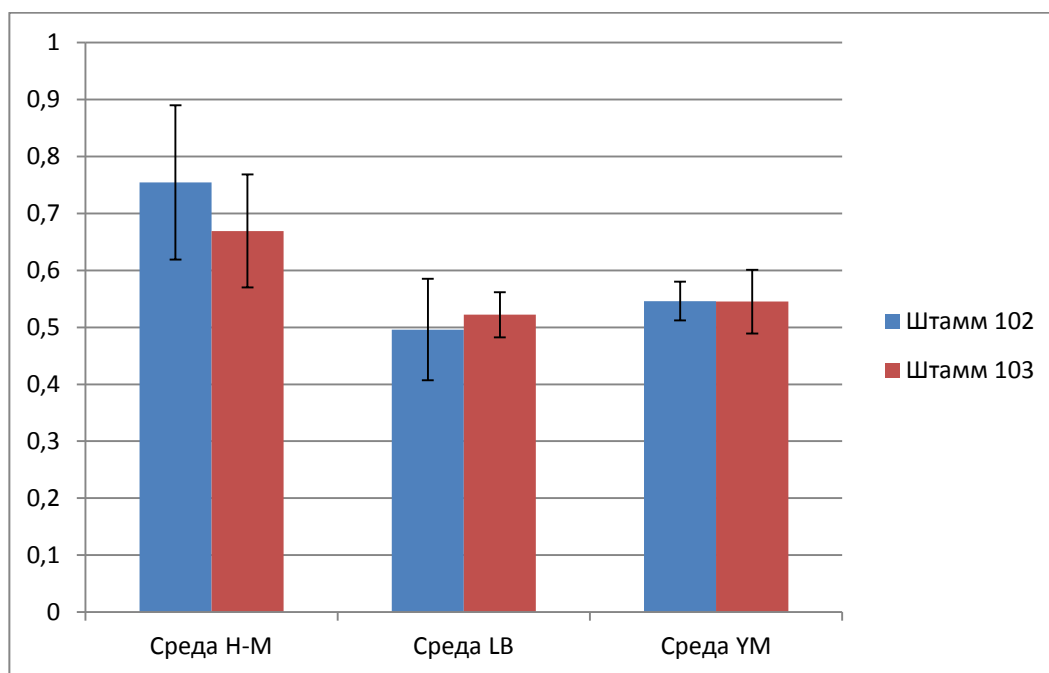


Рисунок 10 – Относительная биомасса биопленок штаммов 102 и 103 после 7 суток культивирования при 28 °С в зависимости от среды. По оси Y – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах.

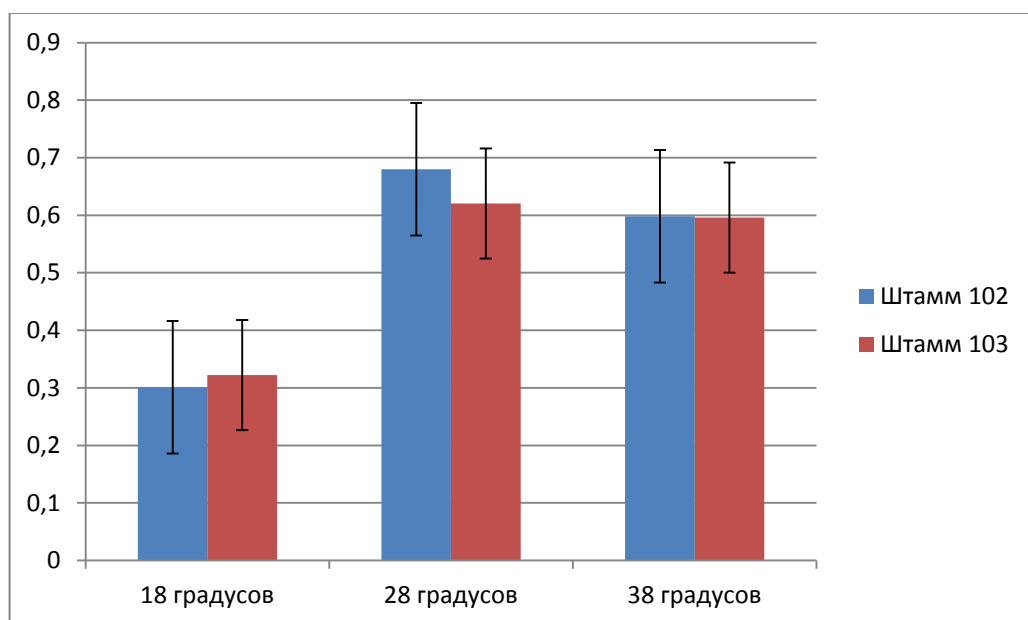


Рисунок 11– Зависимость биопленкообразования от температурных условий штаммов 102 и 103.

3.3 Изучение влияния ДДС на рост биопленок *Pseudomonas* sp шт.102 и 103 на инертных поверхностях

Додецилсульфат натрия (ДДС) относится к поверхностно-активным веществам (ПАВ), химическим соединениям, которые вызывают снижение поверхностного натяжения, концентрируясь на границе раздела фаз. Данный ПАВ входит в состав множества моющих средств. Известно, что ПАВы способны оказывать значительное влияние на рост и образование биопленок микроорганизмами. По данным литературы в зависимости от концентрации ПАВы способны к подавлению или к увеличению роста биопленки (Домрачева и др., 2020).

Для изучения влияния ДДС на рост и биопленкообразование бактерий, штаммы 102 и 103 культивировали на планшетах с УМ средой с концентрацией 0%, 0,02%, 0,05% и 0,1% ДДС. Анализ устойчивости исследуемых штаммов к ДДС показал, что данный детергент отрицательно влияет на рост и формирование биопленок (рис.12) При концентрации ДДС 0,02% толщина биопленок шт. 102 и 103 уменьшалась относительно контроля (без ДДС) в 1,4 раза, при 0,05% в 3,3 раза, при 0,1% 3,7 в раз.

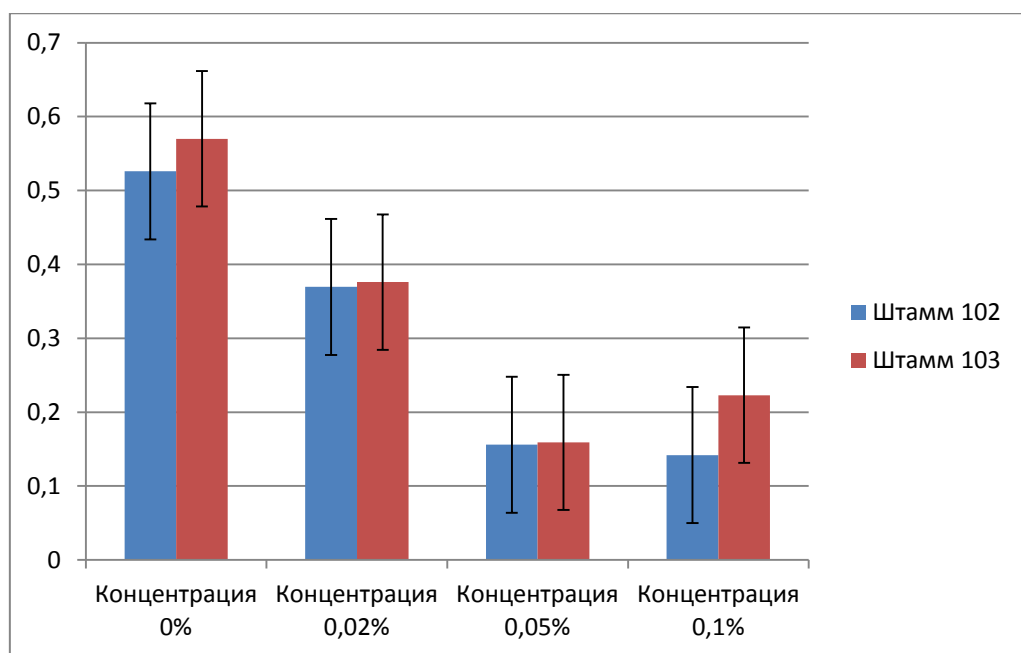


Рисунок 12 – Относительная биомасса биопленок штаммов 102 и 103 после 7 суток культивирования при 28 °С в зависимости от концентрации ДДС.

Таким образом, в диапазоне концентраций 0,02%-0,1% ДДС оказывал подавляющее действие на рост данных штаммов псевдомонад и образование биопленок. Ингибирующий эффект ДДС проявлялся при концентрациях 0,05% и 0,1% ДДС. Данный факт по всей видимости связан с высокой противомикробной активностью ДДС.

Детальное микроскопирование полученных биопленок показало, что в отсутствии ДДС на поверхности полистироловых планшетов бактерии образуют сложно структурированные биопленки. При концентрации ДДС 0,02% структура биопленок значительно упрощается, появляются участки монослоя и отдельные скопления клеток. При концентрациях 0,05% и 0,1% биопленки отсутствуют, имеют место только единичные клетки (рис.13, 14).

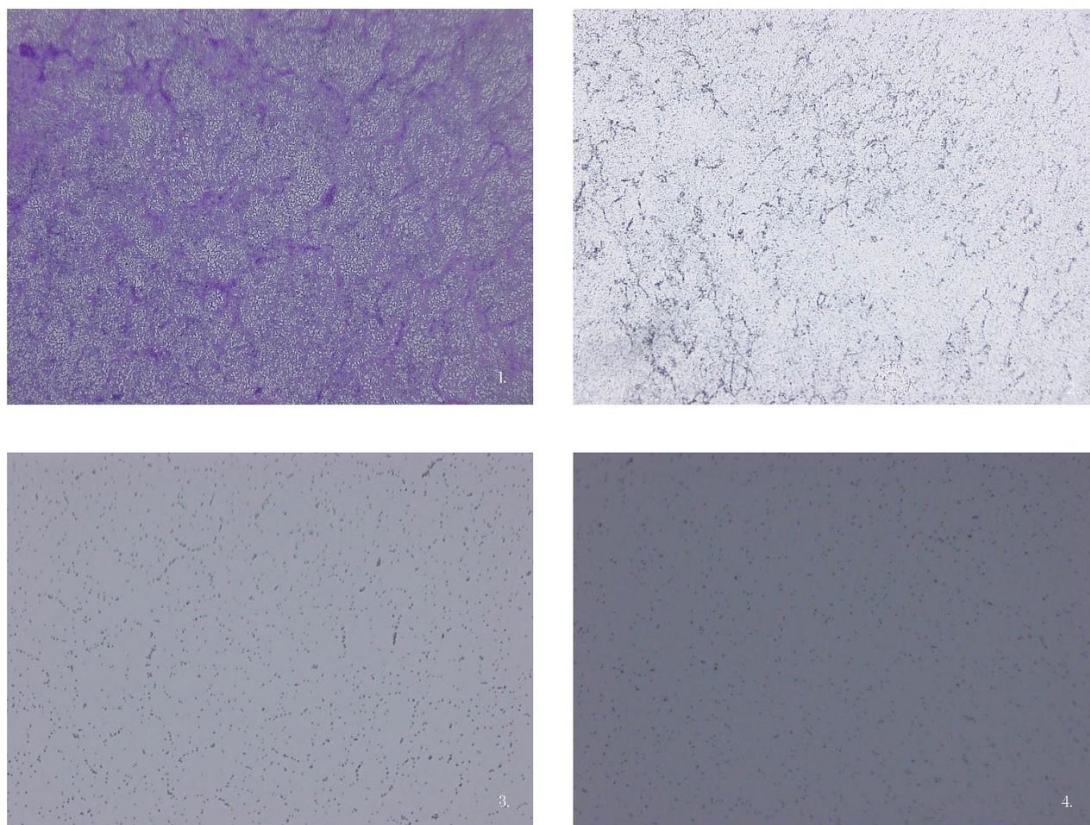


Рисунок 13 – Биопленки *Pseudomonas* sp штамм 102, формируемые на поверхности полистироловых планшетов при различных концентрациях ДДС (1- конц. 0%; 2- конц. 0,02%; 3- конц. 0,05%; 4-конц. 0,1%).

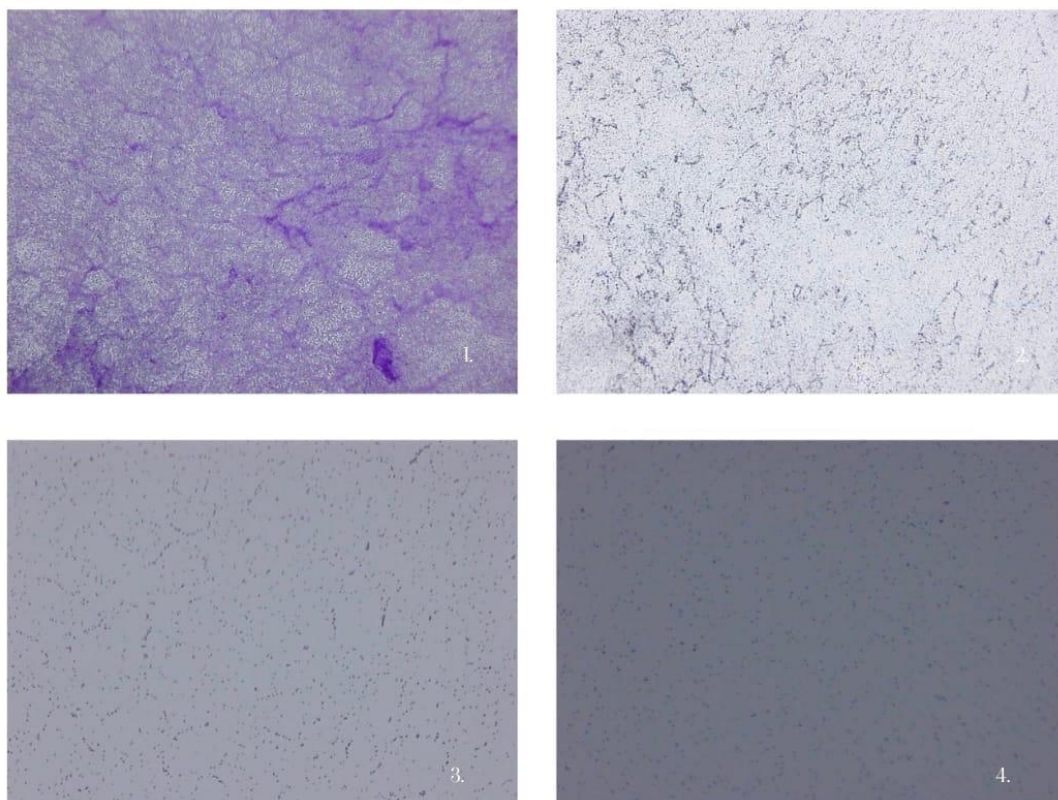


Рисунок 14 – Биопленки *Pseudomonas* sp штамм 103, формируемые на поверхности полистироловых планшетов при различных концентрациях ДДС (1- конц. 0%; 2- конц. 0,02%; 3- конц. 0,05%; 4-конц. 0,1%)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Грамотрицательные бактерии *Pseudomonas* sp широко распространены в природе. Данные бактерии обитают в почве и ризосфере растений, в морских и пресноводных водоемах, в нефтяных и рудных месторождениях. Псевдомонады оказывают чрезвычайно большое влияние на человечество в различных областях: медицине, промышленности, сельском хозяйстве. Псевдомонады используют в сельском хозяйстве в качестве биоудобрений для улучшения роста и продуктивности растений. Бактерии данного рода могут служить источником антибиотиков, противоопухолевых препаратов, витаминов и аминокислот. Псевдомонады активно используются для борьбы с загрязнением окружающей среды. В тоже время род *Pseudomonas* включает множество патогенных для растений, животных и человека штаммов, которые являются возбудителями опасных заболеваний.

Как большинство бактерий, псевдомонады способны к образованию биопленок, которые представляют собой сообщество микроорганизмов, фиксированных на различных поверхностях. В биопленках, в отличие от свободноживущего состояния, бактерии в большей степени защищены от агрессивного воздействия окружающей среды, в том числе от воздействия противомикробных препаратов. Устойчивость биопленок, образуемых псевдомонадами, к антибиотикотерапии создает огромные проблемы в медицине. Большинство бактериальных инфекций, в том числе вызванных псевдомонадами, протекает с образованием биопленок, поэтому большое значение имеют исследования, направленные на изучение условий биопленкообразования бактерий на различных поверхностях, результаты которых могут быть использованы для подавления роста бактерий. В тоже время, подобные исследования в отношении полезных штаммов псевдомонад позволяют создать благоприятные условия для роста и эффективного биопленкообразования бактерий.

В данной работе в качестве объектов исследования были использованы штаммы *Pseudomonas* sp. 102 и 103 из коллекции клубеньковых и ризосферных бактерий “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН, выделенные из клубеньков дикорастущих бобовых растений Южного Урала. В данной работе с помощью диско-диффузионного метода была определена антибактериальная устойчивость шт. 102 и 103 *Pseudomonas* sp. к антибиотикам Am, Tc, Gm. Показано, что наиболее чувствительны данные штаммы оказались к Gm. Наибольшая устойчивость была выявлена к Am. Проведен подбор оптимальных условий для оценки эффективности биопленкообразования на поверхности полистироловых планшетов штаммами *Pseudomonas* sp. 102 и 103. Показано, что данные штаммы способны формировать зрелые биопленки на поверхности полистироловых планшетов, как в бедных, так и в богатых питательными веществами средах в широком температурном диапазоне.

Было исследовано влияние различных концентраций поверхностно-активного вещества ДДС на формирование биопленок на поверхности полистироловых планшетов. Показано, что в отношении исследованных штаммов ДДС оказался эффективным антибиопленочным агентом. При концентрациях 0,05% и 0,1% ДДС оказывал ингибирующее действие на образование биопленок, что связано, вероятно, с антимикробными свойствами данного вещества.

Были проведены микроскопические исследования биопленок штаммов *Pseudomonas* sp 102 и 103, формируемых на поверхности полистироловых планшетов в различных питательных средах, в присутствии различных концентрации ДДС. Показано, что шт. 102 и 103 псевдомонад оказались способны образовывать зрелые биопленки на всех исследованных инертных поверхностях как в бедных, так и в богатых питательными веществами средах.

Выводы:

1. Проведен подбор оптимальных условий для оценки эффективности биопленкообразования на поверхности полистироловых планшетов штаммами *Pseudomonas* sp 102 и 103. Показано, что исследуемые штаммы способны формировать зрелые биопленки на данных инертных поверхностях в условиях, как бедных, так и богатыми веществами сред в широком диапазоне температур.
2. Изучено влияние факторов среды на рост биопленок, образуемых штаммами *Pseudomonas* sp 102 и 103 на поверхности полистироловых планшетов. Показано ингибирующее действие ДДС в концентрациях 0,05% и 0,1% на биопленкообразование на инертных поверхностях указанными штаммами, что выражалось в уменьшении толщины биопленок в 3.3 и 3.7 раза относительно контроля.
3. Проведен микроскопический анализ биопленок, формируемых штаммами *Pseudomonas* sp 102 и 103 на поверхности полистироловых планшетов на различных питательных средах, в присутствии различных концентраций ДДС. Показано, что исследуемые штаммы формируют архитектурно сложные биопленки на инертных поверхностях во всех исследованных средах. В тоже время, микроскопирование выявило отсутствие биопленкообразования на поверхности планшетов при культивировании в присутствии ДДС в концентрациях 0,05% и 0,1%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афиногенова, А.Г. Микробные биоплёнки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. 2011. № 3.– С. 119–125.
2. Бехало, В.А. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок / В.А. Бехало [и др.] // Журн. микробол. – 2010. – № 4. – С. 97–105.
3. Бондаренко, В.М. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококковым метаболитами лактобациллы / В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, О.Г. Орловка // Журналец. микробиология. – 2010. – № 6. – С. 66–70.
4. Бочкова Е.А., Плаунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии. // Микробиология. – 2015. – Т.84. - №6. – С.623-644.
5. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр “Академия”, 2006. – 464 с.
6. Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Быков А. С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. М.: Мастерство, 2001. 224 с.
7. Глушанова, Н.А. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // Медицина в Кузбассе. 2015. № 2. С. 30 – 35.
8. Голуб А.В. бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т.14. - №1ю – С. 23-29.
9. Домрачева Л.И., Выростков В.А. Влияние поверхностно-активных веществ на формирование биоплёнки штаммом *Acinetobacter calcoaceticus*. 2020.

10. Доброхотский, О.Н. Эпидемиологическое значение биоплёнок в технических системах /О.Н. Доброхотский, Ю.Н. Хомяков, Т.И. Хомякова // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2008. № 4.– С. 78–80.
11. Джей Дж. М., Лесснер М. Дж., Гольден Д. А. Современная пищевая микробиология / пер. с англ. Е. А. Барановой [и др.]. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 886 с.
12. Ермолов, А.С. Хирургия желчнокаменной болезни / А.С. Ермоповец // Анналы хирургии. – 1998. – № 3. – С. 13–24.
13. Жарикова Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена. М.: АCADEMA, 2005. 297 с.
14. Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 11. – С. 1445–1456.
15. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - СПб.: 49 СпецЛит, 2008. – 4-е изд., испр и доп. - 767 с.: ил.
16. Леонтьев В. Н., Элькаиб Х. М., Эльхедми А. Э. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения // Труды БГУ. 2013. Т. 8, ч. 1. С. 125–130.
17. Льюис, К. Персистирующие клетки и загадка выживания биоплёнок / К. Льюис // Биохимия. – 2005. – № 70(2).– С. 36–327.
18. Лямин, А.В. Проблемный в медицине, связанные с бактериальными биопленками / А.В. Лямин, Е.А. Ботклин, А.В. Жестков // Клиническая микробиология. антимикробный. химиотер. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 268–274.

19. Марданова А.М. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования: учебно-методическое пособие /А.М. Марданова, Д.А. Кабанов, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова. Казань: Центр печати «Линк», 2016. 0 48 с.
20. Маянский, А.Н. Лекции плод иммунологии / А.Н. Маянский. – Нижнооий Новгородец: изыди–ввоз НГМА, 2003. – 272 с.
21. Маянский, А.Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуффляция, отторжение / А.Н. Маянский, И.В. Чебопптарь // Журналец. микробиология. – 2011. – № 1. – С. 101–108.100
22. Микробиология, вирусология и иммунология : учебник для стомат. факультетов мед. вузов / под ред. В.Н. Царева. - М.: Практическая медицина, 2010. С. 110-2023.
23. Мордухова Е.А., Кочетков В.В., Поликарпова Ф.Я., Боронин А.М. Синтез индолил-3-уксусной кислоты ризосферными псевдомонадами: Влияние плазмид биодеградации нафталина // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34, 3. С. 287-292.
24. Ножевникова А.И., Бочкова Е.А., Плаунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии. // Микробиология. – 2015. – Т.84. - №6. – С.623-644.
25. Плаунов В. К., Мартьянов С. В., Тетенева Н. А., Журина М. В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты//Микробиология, 2017г., том 86, № 4, С. 402–420
26. 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.

27. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальная биоплёнка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина//Журн. Микробиол. 2011г. №3 С.99-109.
28. Тец, Г.В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биоплёнок с антибиотиками (экспериментальное исследование): автореф. дис. канд. мед.наук / Г.В. Тец.– Санкт-Петербург, 2007.– 23 с.
29. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий // Клин. Микробиол. и антимикробхимиотер. 2012. Т. 14. №1: С. 51-58.
30. Чеботарь И.В.; Таланин Е.А.; Кончакова Е.Д. Новый метод количественного учета кокков в надклеточных образованиях — кластерах и биопленке// СТМ 2010г. №3 С.14-16
31. 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 профессорско-преподавательского состава ТулГУ / ТулГУ, 2009. С. 138.
- 32.Ahemad, M., 2014. Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: paradigms and prospects. Arab. J. Chem.
- 33.Blanco Y., Rivas L.A., Gonzalez-Toril E., Ruiz-Bermejo M., Moreno-Paz M., Parro V., Palacin A., Aguilera A., Puente-Sanchez F. Environmental parameters, and not phylogeny, determine the composition of extracellular polymeric substances in microbial mats from extreme environments. Sci. Total Environ. 2019;650:384–393.
34. Borges A., Abreu A.C., Dias C., Saavedra M.J., Borges F., Simoes M. New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control

- bacterial infections including biofilms. // *Molecules*. – 2016. – V. 21. - №7. pii: E877. doi: 10.3390/molecules21070877.
35. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal Biochem*. - 1976. - V.72. - P. 248-254.
 36. Buhmann M., Stiefel P., Maniura-Weber K., Ren Q. In vitro biofilm models for device-related infections. 2014. - V. 1. - P. 1-4.
 37. Cencetti C. Preparation and characterization of antimicrobial wound dressings based on silver, gellan, PVA and borax // *Carbohydr. Polymers*. – 2012. – V.90, N3. – P. 1362-1370.
 38. Dowd, S. E., Wolcott, R. D and Zischakau Y. A. Bacterial diversity in surgical site infections: not just aerobic cocci any more. *Journal of Wound Care*, 2008, vol. pp. 317–323.
 39. Dowd, S. E., Wolcott, R. D and Zischakau Y. A. Bacterial diversity in surgical site infections: not just aerobic cocci any more. *Journal of Wound Care*, 2009, vol. 18, no. 8, pp. 317–323..
 40. Etesami, H., Beattie, G.A., 2017. Plant-Microbe Interactions in Adaptation of Agricultural Crops to Abiotic Stress Conditions. *Probiotics and Plant Health*. Springer, pp. 163–200.
 41. Etesami, H., Jeong, B.R., 2018. Silicon (Si): review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 881–896
 42. Gabani P., Singh O.V. Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013;97:993–1004. doi: 10.1007/s00253-012-4642-7.
 43. Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30–39
 44. Heydarian, Z., Yu, M., Gruber, M., Glick, B.R., Zhou, R., Hegedus, D.D., 2016. Inoculation of soil with plant growth promoting bacteria producing 1-

- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase or expression of the corresponding *acdS* gene in transgenic plants increases salinity tolerance in *Camelina sativa*. *Front. Microbiol.* 7.
45. Janczarek, M.; Rachwał, K.; Turska-Szewczuk, A. A mutation in *pssE* affects exopolysaccharide synthesis by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, its surface properties, and symbiosis with clover. *Plant Soil*. 2017, 417, 331–347.
 46. Janczarek, M.; Skorupska, A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 4132–4155.
 47. Karatan E., Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. // *Microbil. Mol. Biol. Rev.* - 2009. - V.73. - P. 310347.
 48. Kandemir, O. Clarithromycin destroys biofilms and enhances bactericidal agents in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis / O. Kandemir, V. Oztuna, A. Milcan // *Clin Orthopaed Related Research*. – 2005. – V.430 – P. 171–5.
 49. Kaur A., Capalash N., Sharma P. Communication mechanisms in extremophiles: Exploring their existence and industrial applications. *Microbiol. Res.* 2019;221:15–27.
 50. Lewis, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival /K. Lewis *Biochemistry*. 2005. № 54.– P. 49–79.
 51. Liu W., Roder H.L., Madsen J.S., Bjarnsholt T., Sorensen S.J., Burmolle M. Interspecific bacterial interactions are reflected in multispecies biofilm spatial organization. // *Front. Microbiol.* – 2016. – 7. 1366. doi: 10.3389/fmicb.2016.01366
 52. Marczak M., Mazur A., Koper P., Zebracki K. and Skorupska. A. Synthesis of Rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. *Genes*. 2017. 8, 360.

53. Otto M. Staphylococcal biofilms. // Curr Top Microbiol Immunol. - 2008. - V. 322. - P. 207-228
54. Pace J., Rupp M., Finch R. Biofilms infection, and antimicrobial therapy. // Taylor & Francis Group. – 2006. – 520 p. ISBN 0-8247-2643-X
55. Park, J., Bolan, N., Megharaj, M., Naidu, R., 2010. Isolation of Phosphate-Solubilizing Bacteria and Characterization of Their Effects on Lead Immobilization (<Special Issue>International Symposium: Challenges to Soil Degradation Towards Sustaining Life and Environment, Tokyo Metropolitan University Symposium Series No. 2, 2009). ペドロジスト 53, pp. 67–75.
56. Quelas, J.I.; López-García, S.L.; Casabuono, A.; Althabegoiti, M.J.; Mongiardini, E.J.; Pérez-Giménez, J.; Couto, A.; Lodeiro, A.R. Effects of N-starvation and C-source on Bradyrhizobium japonicum exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. Arch. Microbiol. 2006, 186, 119–128.
57. Reichhardt C., Jacobson A., Maher M. Congo red interactions with curliproducing E. coli and native curli amyloid fibers. // PLoS ONE. – 2015. - V.10. - P. 1-10.
58. Rothschild L.J., Mancinelli R.L. Life in extreme environments. Nature. 2001;409:1092–1101
59. Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in Staphylococcus aureus biofilms. Mol Microbiol. 2016 Jan; 99 (1): 123–34.
60. Wakai S. Biochemical and thermodynamic analyses of energy conversion in extremophiles. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2019;83:49–64.
61. Whitfield, C.; Paiment, A. Biosynthesis and assembly of Group I capsular polysaccharides in Escherichia coli and related extracellular polysaccharides in other bacteria. Carbohydr. Res. 2003, 338, 2491–2502.
62. Wösten HA, de Vocht ML. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. Biochim Biophys Acta. 2000 Sep 18; 1469 (2): 79–86.

РЕЦЕНЗИЯ

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

Исмагиловой Залины Рамилевны

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Формирование биопленок штаммами *Pseudomonas* на инертных поверхностях»

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 Технично-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

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

д.б.н профессор кафедры фундаментальной прикладной микробиологии

(Место работы, занимаемая должность)

Баймиев Ан.Х

Подпись Баймиев Ан.Х
удостоверяю.
Начальник управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
Баймиев Ан.Х
«22» июля 2024

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы
(Форма выпускной квалификационной работы)

Б-401 А группы
(Шифр группы)

Исмагиловой Залины Рамилевны

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Формирование биопленок штаммами *Pseudomonas* на инертных поверхностях»

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 Техничко-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)



А.П. Шепелин

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Исмагилова Залина Рамилевна
Самоцитирование
рассчитано для: Исмагилова Залина Рамилевна
Название работы: Формирование биопленок штаммами *Pseudomonas* на инертных поверхностях
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	31.38%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	21.02%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	47.78%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	66.45%
ЦИТИРОВАНИЯ	20.83%	ЦИТИРОВАНИЯ	12.53%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 22.06.2021 07:08

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 22.06.2021

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; Перефразирование по eLIBRARY.RU; Перефразирование по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

22.06.2021

Кобзева

Подпись проверяющего



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

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

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

ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401А
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Исмагиловой Залины Рамилевны
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Формирование биопленок штаммами *Pseudomonas* на инертных поверхностях

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

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).

Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна

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 отличное

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 соответствии 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 отлично при успешной сдаче
Руководитель выпускной квалификационной работы

Научный руководитель:

Профессор д.б.н

Баймиев А.Х.

(Фамилия, имя, отчество, должность)

(Подпись)

Подпись Баймиев А.Х.
удостоверяю.
Начальник управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
Результат отлично
"22" июня 2021 г.