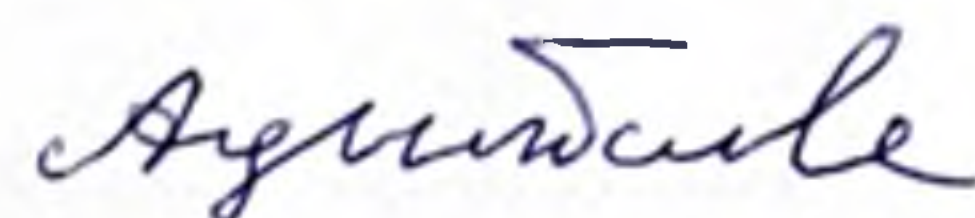


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

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

На правах рукописи



Адылбаева Аделина Эдуардовна

СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ
ПОСЛЕ ИХ ДОЛГОВРЕМЕННОГО ХРАНЕНИЯ МЕТОДОМ
КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Руководитель
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии



Ан. Х. Баймиев

Уфа-2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Актуальность исследования.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	6
1. Важности сохранения штаммов бактерий для медицины и биотехнологии...	6
1.1 Формирование баз данных.....	6
1.2 Базы данных микроорганизмов.....	7
1.3 Депонирование.....	7
1.4 Биорепозиторий.....	8
2 Способы долгосрочного хранения штаммов микроорганизмов.....	10
2.1 Методы непродолжительного хранения.....	13
2.1.1 Субкультивирование, или метод перевиваемых культур.....	13
2.1.2 Хранение под минеральным маслом.....	14
2.1.3 Вода или водно-солевые растворы.....	14
2.1.4 Хранение замораживанием.....	15
2.1.5 Высушивание.....	15
2.2 Методы продолжительного хранения.....	16
2.2.1 Консервация путем жидкостной сушки (L-сушка).....	17
2.2.2 Лиофилизация микроорганизмов.....	17
2.2.3 Консервация путем криогенного замораживания.....	19
2. Строение геномов бактерий: хромосома, хромиды, мобильные генетические элементы, плазмиды, островки мобильности (ICE-элементы).....	22
3.1 Бактериальная хромосома.....	23
3.2 Мобильные генетические элементы.....	23
3. 2. 1 Плазмиды.....	24
3. 2. 2 Инсерционные последовательности (IS-элементы).....	30
3. 2. 3 Транспозоны (Tn).....	30
3. 2. 4 Бактериофаги.....	34
3. 2. 4 Интегроны (In).....	35
3. 2. 5 Геномные острова.....	37
3. 3 ICE-элементы.....	38
4. Изменчивость штаммов бактерий: внутренняя рекомбинационная активность и горизонтальный перенос генов.....	40

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.2.1. Приготовление питательных сред для культивирования бактерий.....	46
2.2.2. Культивирование бактерий в жидких и твердых средах.....	47
2.2.3. Подготовка бактерий к криохранению.....	47
2.2.4. Оживление штаммов бактерий после криохранения.....	47
2.2.5. Выделение ДНК из бактерий.....	48
2.2.6. Постановка полимеразной цепной реакции.....	48
2.2.7. Приготовление 1% агарозного геля для электрофореза.....	49
2.2.8. Электрофорез в агарозном геле.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	50
ВЫВОДЫ.....	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	58

Актуальность исследования

С развитием биотехнологической отрасли, медицины, сельского хозяйства, где постоянно происходит взаимодействие с разного рода бактериями, как полезными, так и патогенными, появляется острая необходимость в глубоком изучении этих объектов. Этот процесс часто бывает растянут во времени и течении этого времени необходимо сохранить изучаемые изоляты в неизменном состоянии, что является сложной задачей. Сложность заключается в том, что бактерии обладают чрезмерной изменчивостью благодаря внутренней рекомбинации генома и горизонтальному переносу генов. Именно из-за этого вначале зарождения микробиологии как науки происходила потеря фенотипических признаков у выделенных изолятов в течение определенного времени и это приводило к значительным проблемам. На сегодняшний день метод пассажей уже уходит в историю и на его место приходят более современные способы долгосрочного хранения бактерий. Наиболее эффективным методом и используемым в настоящее время во всех банках хранения бактерий является способ криоконсервации, при котором культура микроорганизмов в смеси с криопротектором замораживается при низких температурах, имеющих значение ниже -72°C . Считается что при таком способе в бактериях полностью ингибируются все процессы, в том числе и рекомбинационные, что приводит к сохранности и неизменности геномов бактерий, и соответственно к сохранению фенотипов микроорганизмов.

Цель исследования.

Выявить влияние способа криохранения на внутреннюю рекомбинационную активность бактерий, ведущую к изменению их фенотипа.

Задачи исследования.

1. Получить флуоресцентно меченные лабораторные штаммы *E.coli* XL-Blue и дикие штаммы клубеньковых бактерий *R.leguminosarum* ГЛЗ, *R.leguminosarum*

ГЛ9 *Sinorhizobium meliloti* Mlu10 путем трансформации их плазмидным вектором, несущим гены флуоресцентных белков.

2. С использованием маркированных штаммов *E.coli*, выявить стабильность мобильной части генома бактерий при обычном культивировании на питательных средах.

3. Провести анализ влияния способа долгосрочного хранения на потери фенотипических признаков, детерминированных на плазмиде.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. Важности сохранения штаммов бактерий для медицины и биотехнологии

1.1 Формирование баз данных

Формирование микробных коллекций в России началось в 30-е годы прошлого века и продолжается по сей день. По своему составу можно выделить две группы коллекций: служебные коллекции, состоящие из живых образцов или эталонных культур известных видов микроорганизмов, независимо от того, обладают они практически ценными свойствами или нет, и специализированные коллекции, состоящие из живых культур, непосредственно используемых различных областях человеческой деятельности (коллекции промышленных микробов, коллекции не патогенных микробов для сельского хозяйства, коллекции патогенных микробов для растений, патогенов) [1].

Основной целью коллекций микроорганизмов является сохранение чистых культур микроорганизмов, изучение их свойств и идентификация. Сбор международных стандартных типовых штаммов, полученных в лабораториях, выделенных от отобранных или больных людей, животных или переносчиков, является лишь частью процесса коллекционирования. Оригинальные вирусные штаммы должны быть сохранены в течение десятилетий без изменения их первоначальных характеристик, таких как биологические свойства, антигенность, генетическая структура и иммуногенность. Получение ферментов (пектиназы, липазы, целлюлазы, эстеразы др.), белков, каротиноидов и других биологически активных веществ; приготовление инициаторов для отверждения растительных субстратов; получение лечебно-профилактических препаратов для повышения иммунитета человека и животных; получение биологических препаратов для защиты растений от болезней и вредителей; получение препаратов для

уничтожения токсичных органических веществ и бактериальных препаратов для биоремедиации природных и промышленных сред было бы невозможно без коллекции. В настоящее время активно создаются базы данных, содержащие полное описание соответствующих продуктов удобном для использования формате. За последние 15-20 лет произошли изменения, которые напрямую влияют на сферу деятельности коллекций продуктов. Во много раз увеличились цифры, характеризующие биоразнообразие микроорганизмов на планете, и резко возрос интерес к их дальнейшему изучению, доступности, физическому обладанию и размножению *ex situ* новых репрезентативных микроорганизмов [11].

1.2 Базы данных микроорганизмов

Коллекции биологических данных и материалов создаются по всему миру. Базы данных являются фундаментальным элементом организации и эффективного функционирования структур биобанков. Цель создания базы данных – сбор и анализ информации в легкодоступных источниках, а также поиск и сравнение различных штаммов и переносчиков с необходимыми характеристиками в зависимости от их пригодности для решения конкретной задачи. Наиболее эффективными, востребованными и занимающими минимальное время поиска являются базы данных, которые находятся в открытом доступе и которые можно найти, используя поисковые системы интернета [13].

1.3 Депонирование

Депонирование – это передача штаммов микроорганизмов в коллекции в соответствии с установленными правилами с целью их учета, сохранения и предоставления заинтересованным лицам.

Коллекции, подлежащие депонированию, делятся на исследовательские и служебные. Исследовательские коллекции присутствуют во всех крупных научно-исследовательских учреждениях, где различные подразделения

занимаются микробиологическими исследованиями. Отличительной особенностью исследовательских коллекций является то, что они содержат штаммы, необходимые для текущих и будущих исследований. Сервисные коллекции создаются различными исследовательскими учреждениями для хранения и предоставления наиболее ценных штаммов для исследований и применения.

Коллекции хранятся в трех основных формах. Это: хранение или консервация в общественном достоянии, консервация и патентованное хранение [25].

Смотря по тому, в какой форме хранятся коллекции, зависят правила пользования коллекцией, такие как выдача информации и самих образцов третьим лицам. Коллекции доступны для публичного доступа в депозитариях. Там хранятся выделенные в лаборатории штаммы бактерий, или же полученные из природных источников. Депозитарии же предоставляют материал для научных обществ для свободного пользования в исследовательской или любой другой деятельности.

Первое депонирование микробного изобретения произошло в 1949 году, когда штамм, продуцирующий антибиотик хлортетрациклин, *Streptomyces aureofaciens dagger* A-377, был депонирован в Коллекцию исследовательских культур.

Согласно национальным правилам, микроорганизмы – это организмы микроскопических размеров, такие как бактерии, вирусы, микроводоросли, микрогрибы, бактериофаги, микробные консорциумы и клеточные линии, хранящиеся в авторизованных коллекциях [16].

1.4 Биорепопозиторий

Биорепопозиторий – это учреждение, хранящее живые клетки, геномы и биологическую информацию, связанную с генетикой и функционированием биологических систем. В центрах биоресурсов хранятся культивируемые организмы, их воспроизводимые части (геномы, плазмиды, вирусы и образцы

ДНК), коллекции живых, но еще не культивированных организмов, клеток и тканей, а также база данных о хранящихся ресурсах [10].

Центр биоресурсов поддерживает коллекцию биологических материалов и соответствующую информацию, чтобы облегчить доступ к биологическим ресурсам, хранящимся на месте, и обеспечить возможность их использования в разработках. Центры биоресурсов работают в соответствии с национальными законами, руководствами и нормативными актами, призванными выполнять несколько ключевых функций:

- сохранение и предоставление биологических ресурсов для развития науки, производства, сельского хозяйства, окружающей среды, медицины и биотехнологии;
- сохранение биологического разнообразия;
- выявление генетических ресурсов и проведение исследований; -защита генетических ресурсов для развития биотехнологии; -сохранение биологического разнообразия;
- пожертвование биологических ресурсов для защиты прав интеллектуальной собственности [12].

Центры биологических ресурсов создаются на основе наиболее престижных национальных коллекций. Они призваны способствовать развитию биотехнологии, медицины, сельского хозяйства и охраны окружающей среды, предоставляя биологический материал как для исследований и разработок, так и для непосредственного промышленного использования. Растущий объем информации, хранящейся в коллекциях, является ценным источником информации для принятия управленческих решений. Одним из основных условий создания организации биохранилища является демонстрация наличия у нее стратегии долгосрочной устойчивости и заверение владельцев и материнских организаций в том, что функции биохранилища (сбор, обслуживание и предоставление биологических ресурсов) будут поддерживаться в долгосрочной перспективе. Существует ряд причин для создания организации биохранилища:

- для максимального удовлетворения растущего спроса на биологические и генетические ресурсы в науке, промышленности и образовании;
- для увеличения количества и качества продукции;
- управление ресурсами;
- обеспечить высокое качество предоставляемых материалов и информации;
- обеспечить, чтобы материал, поступающий в коллекцию и обладающий определенными характеристиками, выделялся в ней как более качественный и характерный;
- поддерживать единые стандарты передачи и приема информации;
- соблюдать единые требования биобезопасности;
- обеспечить развитие биотехнологии [11].

Был разработан комплекс стандартов в отношении содержания каталога, биобезопасности и биоинформатики. Потребители, ищущие культуру и информацию, вправе ожидать биоматериалы сопоставимого качества.

2 Способы долгосрочного хранения штаммов микроорганизмов.

Основными целями консервации являются поддержание жизнеспособности клеток и чистоты культур, а также предотвращение мутационных изменений. От того, как успешно удалось сохранить нужные культуры бактерий, зависят дальнейшие работы с ними. Для того чтобы обеспечить предприятия чистыми культурами микроорганизмов, необходимо активировать их в коллекционных условиях и обеспечить сохранение их биотехнологических свойств. Выбор метода хранения обычно определяется наличием оборудования, складских помещений и достаточного количества квалифицированного персонала. В крупных коллекциях большое количество разнообразной микробиоты хранится различными способами, чтобы избежать потери микроорганизмов, причем каждый штамм хранится несколькими способами одновременно [7].

Существующие методы хранения можно разделить на краткосрочные и долгосрочные методы хранения микроорганизмов [23].

Краткосрочные методы хранения включают:

- 1) методы субкультуры или инокуляционной культуры;
- 2) методы сохранения под минеральным маслом;
- 3) методы хранения в солевом растворе или в воде;
- 4) замораживание при температуре ниже точки кристаллизации воды;
- 5) консервация путем высушивания на твердой подложке.

Наиболее перспективными методами длительного сохранения считаются:

- 1) консервация путем высушивания из жидкого состояния;
- 2) консервация путем сублимационной сушки;
- 3) криоконсервация при низких температурах.

Преимущества этих методов включают стабильные характеристики культуры из-за низкого риска генетических изменений, низкие материальные и временные затраты, а также возможность использования замороженных образцов для прямой инокуляции. Микроорганизмы, сохраненные при низких температурах, также меньше повреждаются и имеют более высокие показатели выживаемости, чем высушенные или сублимированные [21].

Независимо от разнообразия методов хранения, недостаточно изучен сам процесс перехода бактерий в жизнеспособное состояние.

Количество исследований, изучающих структурную и функциональную реорганизацию микробных клеток под воздействием защитных и оживляющих факторов, значительно сократилось в конце 1980-х годов [57]. Имеющаяся информация представляется достаточной для практического применения в

течение нескольких десятилетий. Эффективность многих современных методов консервации для сохранения лабораторных культур подтверждена обширным опытом работы в коллекциях. Несмотря на свою эффективность, метод консервации все еще содержит некоторые проблемы, связанные с разнообразием микроорганизмов, а именно штаммами бактерий, которые приспособлены к самым различным условиям окружающей среды [57]. Это указывает на необходимость анализа происходящих в природе процессов, которые позволяют многим микроорганизмам продолжать выживать даже в самых экстремальных условиях.

Различные методы консервации клеток, основанные на преодолении энергетических ограничений, могут позволить поддерживать генетическую стабильность и жизнеспособность микроорганизмов в течение продолжительных периодов времени. Исследования, направленные на формирование, характеристику и прорастание специализированных покоящихся клеток микроорганизмов, привели к разработке ряда методик, позволяющих сохранять клетки в анабиозном состоянии. Некоторые из этих методов могут использовать комбинации различных механизмов и применяться в зависимости от типа микроорганизма и условий, необходимых для его сохранения. Однако, не все методы консервации используются на практике, и дальнейшие исследования позволят раскрыть новые возможности в сохранении генетической стабильности и жизнеспособности микроорганизмов.

Современные методы защиты обычно направлены на то, чтобы создать как можно меньше специфических методов инактивации различных микробных клеток растений. Существуют также микроорганизмы, которые невозможно культивировать, поэтому их так важно сохранить, для чего и разработаны различные методики сохранения-реактивации [5].

2.1 Методы непродолжительного хранения

2.1.1 Субкультивирование, или метод перевиваемых культур

Традиционный метод сохранения бактериальных культур заключается в периодическом пересеве их на свежую среду. Интервал между пересевами зависит от микроорганизма, используемой среды и условий окружающей среды. Некоторые бактерии необходимо пересевать каждые два дня, другие – каждые несколько недель или месяцев [23].

При хранении культур этим методом должны быть соблюдены три условия

Во-первых, подходящая поддерживающая среда. Рекомендуется минимальная среда, которая подавляет метаболические процессы микроорганизмов и увеличивает интервал между пересадками. При выращивании бактерий необходимы сложные среды, использование которых может привести к ускоренному росту бактерий и накоплению конечных продуктов метаболизма, что, в свою очередь, может потребовать более частой пересадки.

Во-вторых, для хранения микробных культур важно учитывать оптимальную температуру. Для этого можно использовать герметичные контейнеры при комнатной температуре, а для снижения высыхания культур можно использовать хлопчатобумажные марли и Parafilm. При хранении культур в бытовом холодильнике при температуре 5-8°C можно замедлить их метаболизм. Если соблюдать эти простые условия хранения, большинство бактерий можно хранить без пересева в течение 3-5 месяцев.

В-третьих, важна частота пересевов, которая должна проводиться максимально редко. И после каждого пересева следует проверять колонии бактерий на различные фенотипические изменения. Обязательно должны храниться дубликаты культур, они понадобятся, если культура вдруг потеряется. Важно отметить, что выделение отдельных колоний из ресуспендированных культур является нежелательным, так как это может

увеличить вероятность отбора мутантов. В целях сохранения чистоты культуры необходимо соблюдать указанные выше меры. Однако, в случае возникновения проблем, рекомендуется обратиться к опытным специалистам и провести дополнительные эксперименты с целью выявления причин возникновения нежелательных изменений в культуральной среде [18].

2.1.2 Хранение под минеральным маслом

Бактерии под минеральным могут храниться от нескольких месяцев до нескольких лет. Используемое медицинское минеральное масло стерилизуется в сухожаровом шкафу при температуре 170°C около 1-2 часа. Сами штаммы бактерий культивируются на агаровых столбиках или в жидких средах. После того, как колонии выросли, в пробирку заливается минеральное масло высотой 2-2,5 сантиметра. Метаболическая активность и рост культуры замедляются из-за ограничения воздействия воздуха. Пробирки с бактериями хранятся в холодильнике. Время от времени рекомендуется обновлять культуры, пересеивая на новую среду, а затем заливая минеральным маслом [36].

Некультивированные культуры бактерий хранятся под слоем масла 1-12 лет, но срок зависит от особенностей вида и штамма.

Из недостатков метода: снижается рост бактерий, а также их продуктивность [36].

2.1.3 Вода или водно-солевые растворы

Первые эксперименты по сохранению в рассоле или дистиллированной воде были проведены с некоторыми видами фитопатогенных бактерий и микроскопических грибов, которые сохранялись до двух лет, хотя и не всегда. Также сообщалось об успешном сохранении бактерий рода *Acinetobacter* и дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*. Этот метод считается применимым для большинства микроорганизмов, например, для сохранения в течение одного месяца. В этом методе микробные клетки находятся в состоянии гипобиоза (покоя) [32].

Клетки с плотностью 10^9 КОЕ/мл или менее добавляют в пробирку, содержащую адвентивную жидкость (воду, глицериновое масло) физиологического ионного состава и соответствующего pH. Например, оптимальный pH для хранения *E. coli* в течение 1 месяца составляет 8 единиц, а для *S. cerevisiae* – 5,5 единиц. Инокуляционные пробирки следует хранить в холодильнике при температуре 4-8°C. Условия в пробирках благоприятны для роста флоры (влажность и температура), что может привести к контаминации штаммов [23].

2.1.4 Хранение замораживанием

Пробирки с культурами микроорганизмов помещаются в морозильную камеру при температуре от -10°C до -20°C. Этот метод удобен, когда приходится хранить большое количество изолятов, так как микроорганизмы сохраняют способность к росту после размораживания. Срок хранения микроорганизмов варьирует от полугода до двух лет; но, после опытов с молочнокислыми бактериями, было доказано, что палочковидные бактерии сохраняют свою метаболическую активность и способность к росту в норме, если срок хранения не превышает 1 месяца, а у шарообразных штаммов – 6 месяцев [40].

Если бактерии чувствительны к холоду, то использовать этот метод хранения нежелательно, так как высок риск повреждения микроорганизмов, а также горизонтального переноса генов, из-за чего культуры в дальнейшем будут неоднородными [32].

2.1.5 Высушивание

Этот метод консервации использует процесс высушивания микробных клеток. Это один из самых простых методов. Когда клетки высушены (10-12% остаточной воды), биохимические реакции значительно замедляются или останавливаются. Спорообразующие виды более приспособлены к процессу сушки. Воздушная сушка микроорганизмов на различных адсорбентах, таких

как стерильная почва, песок, глина, фильтровальная бумага, стеклянные шарики и крахмал, является широко используемым методом. Адсорбенты защищают микроорганизмы от интенсивного высушивания, связывают свободную воду и поддерживают постоянную влажность [21].

Высушенные микробные культуры легко хранить и транспортировать, они широко используются для сохранения пекарских дрожжей, кормовых дрожжей, бактериальных удобрений (нитрагин, нитробактерины) и энтомопатогенных препаратов.

Бумажно-сухой метод подходит для контроля качества сельскохозяйственной продукции. Поскольку полоски или диски фильтровальной бумаги, пропитанные бактериальной суспензией, просто высушиваются на воздухе или в вакууме, этот метод считается относительно простым и недорогим. Рекомендуется использовать вакуумную сушку. Несколько дисков за один раз можно хранить в пробирках с обычными закручивающимися крышками. При необходимости диски можно извлечь из пробирки стерильным пинцетом и перенести в питательную среду в стерильных условиях. Полоски или диски помещают в герметичные пробирки и хранят в холодильнике в дезинфицирующих средствах [18].

2.2 Методы продолжительного хранения

Долгосрочное сохранение клеток без потери ценных свойств может быть достигнуто методами, которые значительно подавляют жизненные процессы, происходящие внутри клеток. Это достигается путем глубокой заморозки микроорганизмов, высушивания их из замороженного состояния (лиофилизация) или высушивания непосредственно из жидкого состояния (L-сушка). Высокий консервирующий эффект этих методов достигается путем принесения в жертву клеток, потерявших свободную воду при отрицательных или криогенных температурах и находящихся в состоянии анабиоза.

2.2.1 Консервация путем жидкостной сушки (L-сушка)

Высушивание жидкостью – это разновидность высушивания на твердом носителе (сорбенте), таком как почва, бумага или стеклянные шарики, который является самым простым методом краткосрочного сохранения микроорганизмов. Процесс высушивания обезвоживает клетки и ингибирует биохимические реакции.

Спорообразующие виды бактерий лучше всего переносят процесс сушки. Адсорбенты защищают клетки от чрезмерного высушивания [17]. L-сушка отличается от обычной сушки тем, что микроорганизмы в суспензии высушиваются в вакууме в стеклянных ампулах, а затем погружаются в водяную баню при определенной температуре. Другими словами, культура в жидкой среде высушивается под вакуумом. Метод жидкостной сушки включает два этапа: первичную и вторичную сушку. Микроорганизмы, которые не выдерживают замораживания или сублимационной сушки, могут быть сохранены с помощью этого метода. Однако этот метод очень сложен и требует множества этапов: подготовка микробных клеток, подготовка стабилизационной среды, заполнение ампул и сушка. Он также требует дорогостоящего оборудования, способного воспроизвести ключевые параметры для бережного обезвоживания бактериальных клеток [18].

2.2.2 Лиофилизация микроорганизмов

Лиофилизация является одним из наиболее экономичных и эффективных методов длительного сохранения бактерий и других микроорганизмов. Используя этот метод, бактерии и бактериофаги физиологически разных видов можно сохранять в активном состоянии более 30 лет, поддерживая жизнеспособность коллекции. Этот метод позволяет хранить бактерии в ампулах небольшими порциями. Сама процедура лиофилизации довольно проста, но ее теоретические аспекты достаточно сложны [17].

Лиофилизация – это сложный метод сублимационной сушки биологического материала, при котором вода испаряется без размораживания в условиях вакуума, что позволяет полностью сохранить основную структуру высушенного объекта.

Успех лиофилизации зависит от качества, жизнеспособности и условий культивирования используемых клеток. Используют клетки, отобранные в конце экспоненциальной и в начале стационарной фазы роста, когда клетки наиболее стабильны.

На то, сколько бактерий остаются способными выполнять свои функции после лиофилизации влияют вид и характеристики штамма, фазы роста и концентрации клеток, состав защитной среды, режим лиофилизации и условия реактивации. После лиофилизации клетки спасают от анабиоза и корректируют условия для снижения стресса от осмотического шока или вскрытия ампулы. Лиофилизация удаляет воду из объекта без нарушения естественной структуры белка, образуется рыхлая структура. Высокая растворимость и регидратационные свойства. При добавлении воды к лиофилизированным бактериям они восстанавливают свои первоначальные свойств [15].

Процесс лиофилизации проходит в несколько этапов:

1) Быстрое замораживание клеток в ампулах в специальной рабочей камере. Чем быстрее температура достигает нужного значения, тем быстрее лед испаряется из образца в процессе сушки.

2) Первичная сушка: лед испаряется из замороженного раствора и попадает в конденсатор. Во время этого процесса происходит осушение всей системы.

3) Вторичная сушка: водяной пар движется под парциальным давлением к змеевику конденсатора [22].

Поскольку лиофилизированный препарат содержит очень мало воды, этот метод идеально подходит для быстрорастворимых культур. Еще одним преимуществом лиофилизации является то, что она предотвращает разрушение и денатурацию культур и лучше всего подходит для штаммов с высокой термостойкостью и сильной окислительной способностью. Кроме того, однородное распределение неорганических соединений в тест-культурах предотвращает застывание. Это простой в использовании, стерильный метод: Оборудование герметично и высоко стерильно, поэтому вероятность загрязнения тест-культуры минимальна. Отсутствие кислорода также способствует стерилизации и останавливает рост микробного загрязнения.

Чем меньше температура, тем клетки лучше сохраняются. Поэтому бактерии, подверженные лиофилизации обычно хранят в холодильниках при 2-4°C. Чтобы вернуть культурам бактерий жизнеспособное состояние, в ампулы, где они хранились, добавляют небольшое количество стерильной среды и тщательно перемешивают до полного растворения лиофилизата. Затем получившуюся суспензию переливают в колбу или пробирку с жидкой средой, инкубируют, а после пересевают с жидкой среды на твердую.

2.2.3 Консервация путем криогенного замораживания

Криоконсервация в настоящее время широко используется для сохранения микроорганизмов, являющихся объектом биотехнологии, поскольку она обеспечивает сохранение генетической стабильности и основных физиологических и биохимических свойств культур. Было показано, что сохранение при температуре жидкого азота приводит к высокой выживаемости бактерий (80-99%), сохранению основных морфологических и функциональных свойств и стабильного потенциала роста. Было установлено, что медленное охлаждение (4°C/мин) является наиболее подходящим методом замораживания для жидких культур, а быстрое охлаждение (400°C/мин) – для концентрированных суспензий. Выживание бактерий при криоконсервации сильно зависит от скорости замораживания и нагревания [20]. Ученые

стремились понять, как микроорганизмы способны выживать в повреждающих условиях, вызванных низкими температурами, а также определить, что заставляет организмы сопротивляться переохлаждению и замораживанию. В результате родился «метод замораживания».

Замораживание микроорганизмов замедляет или останавливает клеточный метаболизм, буквально превращая воду в лед. В частности, криоконсервация – это процесс замораживания клеток до состояния глубокого анабиоза и последующего возвращения их в исходное состояние. Штаммы, сохраненные таким образом, имеют значительное преимущество перед лиофилизацией в том, что их можно использовать сразу после реактивации, не проходя через период адаптации бактериальной культуры [19]. Условия культивирования клеток, методы разведения и питания, а также состояние клеток во время замораживания имеют немаловажное значение для их выживания при замораживании. Например, клетки на ранних стадиях роста более чувствительны к низким температурам.

Существует два типа процессов, которые влияют на выживание клеток в суспензии во время замораживания. Первый процесс приводит к необратимой денатурации растворенных белков, обессоливанию цитоплазматической мембраны и уменьшению объема клетки. К этому приводит чрезмерное обезвоживание клетки и, следовательно, повышение концентрации осмотически активных веществ в клетке; второй процесс связан с повреждением внутриклеточного содержимого путем развития внутриклеточной кристаллизации.

Чтобы защитить микроорганизмы путем криоконсервации, клетки следует подготовить, суспендировав их в среде, содержащей криопротектор. Затем образец переливают в стерильный контейнер, устойчивый к повреждению при замораживании, и герметично закрывают. Затем их замораживают в контейнере, заполненном жидким азотом. Для оживления

культуры прогревают на водяной бане до полного растапливания льда. Оттаявшую суспензию бактерий пересеивают в свежую среду [3].

В качестве хладагентов используются сжиженные газы, такие как воздух, азот, неон, водород и гелий, обеспечивают поддержание температуры. В качестве хладагентов эти газы могут храниться относительно длительное время в бутылках Дьюара [7].

Чувствительность бактерий к воздействию низких температур очень индивидуальна, и они по-разному реагируют на различные факторы. В зависимости от их чувствительности микроорганизмы можно разделить на четыре группы:

- 1) микробы, которые переносят почти все условия замораживания и оттаивания;
- 2) микроорганизмы, которые переносят прямое воздействие низких температур, но уязвимы к последующим условиям хранения;
- 3) штаммы, восприимчивые к прямому замораживанию и его долгосрочным последствиям;
- 4) культуры, которые не переносят замораживание при различных условиях.

Высококонцентрированные растворы внутри и вне клетки кристаллизуются, и клетки подвергаются воздействию комбинации физико-химических стрессовых факторов в дополнение к низким температурам (от -20 до -196°C). Например, изменения pH среды и осмотические градиенты концентрации. Из-за резкого перепада температур, неравномерного охлаждения цитоплазма клеток кристаллизуется в лед, вследствие чего клетки повреждаются изнутри и погибают. Или же в мембранах образуются дыры, и внутреннее содержимое клеткок вытекает. Если бактериальные культуры

охлаждать постепенно и медленно, то никаких кристаллов льда и дыр в мембранах не образуется.

Оптимальная скорость – это скорость, при которой клетки повреждаются меньше всего. Повреждение клеток также связано со степенью кристаллизации воды, зависящей от количества и формы кристаллов. Оно связано с интенсивностью и степенью обезвоживания клеток. Каждый тип клеток имеет оптимальную скорость охлаждения, при которой клетка сохраняет свою структуру. Эта скорость достаточно мала, чтобы не оставлять времени для развития кристаллизации в клетке, но достаточна для минимизации времени воздействия клетки на рассольный раствор, получаемый при замораживании воды в виде чистого льда [3].

Недостатки этого типа защиты от микроорганизмов заключаются в том, что он требует специализированного оборудования, является дорогостоящим, и необходимо соблюдать осторожность при проверке герметичности стеклянных ампул, чтобы убедиться, что они не лопнут.

2. Строение геномов бактерий: хромосома, хромиды, мобильные генетические элементы, плазмиды, островки мобильности (ICE-элементы).

У прокариот отсутствует оформленное ядро. Однако отсутствие ядра является лишь внешним проявлением особой организации прокариотического генома [8].

Геномы прокариот очень плотные. Размер прокариотических геномов варьирует от 580 000 п.н. у *Mycoplasma genitalium* до 9 500 000 п.н. у *Mucococcus xanthus*. Размер генома *E. coli* составляет 4 600 000 п.н. Для сравнения, геном эукариот (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*) составляет 12 068 000 п.н. Количество некодирующих нуклеотидных последовательностей минимально. Бактериальные хромосомы могут быть линейными или кольцевыми. Геномы прокариот могут содержать внехромосомные элементы.

Точка, в которой бактериальная хромосома присоединяется к мезосоме, является началом репликации и называется *oriC* (origine); репликация ДНК идет в двух направлениях от *oriC* и заканчивается на *terC* (terminus). Жизненные циклы у прокариот простой, поэтому и сам геном тоже простой [14].

3.1 Бактериальная хромосома

Хромосома бактерий представляет собой двуспиральную молекулу ДНК, образующую кольцо и закрученную в шпильку, из-за чего хромосома сверхспирализована. По-другому сверхспирализованную кольцевую хромосому бактерий называют нуклеоидом. Нуклеоид состоит из ДНК, белков и РНК, находится в середине бактериальной клетки и имеет хорошо очерченные границы, чем напоминает ядро эукариот. Репликация начинается с точки инициации репликации *oriC*, которая прикреплена к клеточной мембране, и идет одновременно в две стороны до точки терминации репликации *terC*.

Кэйрнс в своих экспериментах доказал, что геном прокариот кольцевой, а также сделал фотографии нуклеоида *E. coli* во время деления и в покое [38].

3.2 Мобильные генетические элементы

Немаловажную роль играют мобильные генетические элементы, с помощью которых бактерии быстро адаптируются к изменяющимся условиям окружающей среды и являющиеся важным звеном в диверсификации бактерий [45]. Семейство прокариотических мобиломов включает спектр высокомобильных элементов с различной предрасположенностью к рассеиванию и миграции, и они широко представлены в различных бактериальных таксонах.

Нуклеиновые кислоты мобильных генетических элементов обладают подвижностью как внутри бактериального генома, так и между клетками одного штамма.

Многие из перечисленных видов обильных генетических элементов широко распространены в различных видах бактерий и характеризуются значительным разнообразием структуры, свойств и механизмов участия в различных биологических процессах. МГЭ имеют модульную структуру и могут кодировать различные функции, из-за чего их трудно классифицировать. Прокариотические мобиломы трудно поддаются осмысленной визуализации, поскольку, в отличие от бактерий, которые их несут, в большинстве случаев их элементы представляют собой нити ДНК, встроенные в геном [44, 60, 64]. Обсудим структуру и функции некоторых представителей прокариотического мобилома более подробно.

3. 2. 1 Плазмиды

Плазмиды являются внехромосомными репликонами и наиболее широко распространены среди прокариотических МГЭ. Плазмиды представляют собой двухцепочечную замкнутую кольцевую ДНК, необязательную структуру размером 0,1-5% от размера хромосомы, кодирующую гены, требующиеся только в определенных условиях. Количество плазмидной ДНК в клетке обычно не превышает нескольких процентов клеточного генома, а количество плазмид колеблется от 1 до 38. Факторы устойчивости, или R-факторы, это внехромосомные элементы, содержащие гены, которые способны наделять клетки бактерий устойчивостью к одному или нескольким антибиотикам. Кроме того, наличие различных плазмид может влиять на вирулентность патогенных бактерий, включая штаммы кишечной палочки, возбудителей чумы и столбняка. Эти плазмиды содержат гены, определяющие способность бактерий к поражению организма и вызыванию опасных заболеваний.

Существуют также плазмиды, которые способны определять способность почвенных бактерий утилизировать необычные источники углерода, такие как нефтяные углеводороды. Бактерии, наделенные этими

плазмидами, могут существовать в условиях, когда другие организмы не способны выживать.

Важно отметить, что наличие этих плазмид может привести к распространению устойчивости бактерий к антибиотикам и ухудшению эффективности лечения. Бактерии, обладающие R-факторами и другими плазмидами, могут оказаться повышенно устойчивыми к множеству антибиотиков, что делает терапию таких инфекций более сложной и дорогостоящей. Поэтому изучение плазмид и механизмов их передачи в бактериальных сообществах является важным направлением в бактериологических исследованиях [14].

Плазмиды являются распространенными формами молекулярной информации в биологических системах. Они характеризуются наличием специфического модульного сегмента ДНК, который используется для их классификации. Плазмиды реплицируются внутри клетки-хозяина, используя ее механизмы репликации. Однако они продолжают репликоваться, даже если хромосома клетки не делится. Каждая плазида представляет собой независимый репликон, который контролирует свой собственный процесс репликации. Это достигается через наличие нескольких модулей репликации, обеспечивающих автономный процесс репликации.

Существует два типа репликации плазмид. В одном из них (строго контролируемый тип), репликация и сегрегация плазмид контролируются в координации с репликацией бактериального генома. Это означает, что каждая клетка имеет одну или две копии плазмиды. В другом типе репликации (репликация со свободным контролем), модуль репликации не подвержен такому контролю. В результате возникают множественные копии (10-30 копий) плазмиды внутри клетки.

Модули, не участвующие в репликации, отсутствуют у некоторых плазмид. У плазмид, являющихся половыми факторами, например F-фактором, наличие модулей, содержащих регуляторные области и гены (tra-гены), необходимо для эффективного переноса плазмиды из одной клетки в

другую. Данные плазмиды синтезируют специализированные хорионические ворсинки, которые образуются на поверхности клеток с плазмидой. Данные ворсинки могут специфически связываться с клетками, которые не содержат плазмиду.

Затем ворсинки хориона сокращаются, притягивая клетки друг к другу и образуя между ними мостики, по которым ДНК плазмиды может быть перенесена в новые клетки.

Плазмиды – это кольцевые молекулы ДНК, способные передаваться между бактериальными клетками. Одним из полезных свойств плазмид является способность переноситься в новые клетки [24]. Но, исполняя эту функцию, плазмиды могут столкнуться с проблемой – некоторые виды плазмид не могут самостоятельно перенестись в новую клетку, обусловлено это наличием специальной системы изменений клеточной поверхности, обеспечивающей конъюгацию. В этом контексте следует отметить, что только крупные плазмиды могут кодировать данную систему. Однако, даже неконъюгативные плазмиды, то есть лишенные данного модуля, могут быть переданы в присутствии трансмиссивных плазмид, использующих механизм конъюгации. Соответственно, такие плазмиды получили название мобилизуемых плазмид.

В бактериальных клетках находятся плазмиды, которые содержат различные модули устойчивости к антибиотикам и антибактериальным агентам. Один тип модуля содержит гены, кодирующие белковый продукт (например, Р-лактамазу), который инактивирует антибиотики. Плазмиды с такими модулями называют R-плазмидами. Они могут содержать различные типы генов устойчивости к нескольким антибиотикам в одном модуле.

Другой тип плазмид содержит модуль Col, который кодирует один из белков колицинов, антибактериальных агентов, вырабатываемых бактериями. Колицины различаются по структуре и механизму действия. Плазмиды, кодирующие определенный колицин, содержат гены, которые обеспечивают иммунитет к нему, защищая предшественников клеток от повреждения их

собственными защитными силами. Таким образом, плазмиды служат важным источником горизонтальной передачи генов устойчивости и иммунитета в бактериальной популяции, что является серьезной угрозой для общественного здоровья [26].

Анализ последовательности плазмид выявил, что около половины из приблизительно 100 000 п.н. последовательностей генома соответствуют региону F-плазмиды. Данный регион содержит набор генов, ответственных за конъюгацию (*tra*) и строго контролируруемую репликацию. Одновременно был обнаружен дополнительный модуль, содержащий гены, ответственные за устойчивость к тетрациклину, расположенный в области, аналогичной F-плазмиде. Вторая половина плазмиды, которая не связана с F, содержит модули, контролирующие устойчивость к антибиотикам [24]. Данный факт подчеркивает значимость и разнообразие генетических механизмов, обеспечивающих устойчивость микроорганизмов к негативным воздействиям, таким как антибиотики, и позволяет более полно понимать эволюционные изменения, возникающие у патогенных бактерий в процессе длительного взаимодействия с их окружением.

Исследование генетики бактерий установило тесную связь между плазмидами, выделенными в разных регионах мира и содержащими одни и те же гены устойчивости к антибиотикам. Была выдвинута гипотеза об обмене генетическими модулями между плазмидами в виде неповрежденных сегментов ДНК. Этот процесс обмена модулями является основной причиной быстрого распространения генов устойчивости к антибиотикам. Исследования также позволили выявить мобильные элементы, такие как инсерционные последовательности (IS) и транспозоны, способные перемещаться между плазмидами, геномами клеток и внутри бактериального генома. Таким образом, изучение генетики бактерий дало возможность установить механизмы распространения генов устойчивости к антибиотикам и выявить мобильные элементы, играющие важную роль в этом процессе [26].

В эволюции бактерий плазмиды играют важную роль благодаря их способности быстро копироваться и передаваться от клетки к клетке внутри, между и внутри видовых ассоциациях. Как автономные репликоны, плазмиды широко используются в генной инженерии и промышленном производстве биологически активных белков. Они могут использоваться для создания гибридных форм и генетического картирования организмов, так как многие из них функционируют как факторы бактериальной зародышевой плазмы. В данном контексте, плазмиды представляют собой важный инструмент для изучения генетики и биологии бактерий, а также для разработки препаратов на их основе.

Роль плазмид в развитии инфекционных заболеваний и эпидемических процессов может быть определена через открытие плазмид, управляющих вирулентностью в популяциях различных видов патогенных и условно-патогенных бактерий. Это открытие указывает на необходимость получения данных о типах R-плазмид и их распространенности в современных микробных сообществах для разработки стратегий рационального использования антибиотиков и других противомикробных препаратов в лечении инфекционных заболеваний.

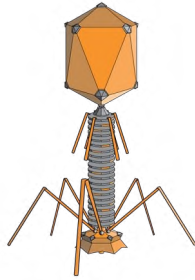
Одним из негативных последствий меж- и внутривидового переноса плазмид является образование атипичных бактерий, что затрудняет диагностику инфекционных заболеваний. Это объясняется тем, что перенос плазмид, контролирующих различные метаболические функции клеток, таких как способность к строгому перевариванию определенных углеводов или производству сероводорода, может привести к изменениям в фенотипе бактерий. Эти изменения могут затруднить диагностику и лечение инфекционных заболеваний.

Следовательно, понимание роли плазмид в развитии инфекционных заболеваний крайне важно для разработки эффективных стратегий лечения. Изучение типов R-плазмид и их распространенности в микробных сообществах должно быть проведено в целях предотвращения переноса

плазмид и образования атипичных бактерий, ухудшающих лечение инфекционных заболеваний.

Внутри бактериальных клеток плазмидные модули локализованы в цитоплазме или встроены в хромосомы. Другие элементы мобильных генетических элементов IS-элементы, транспозоны (Tn), интегроны (In), бактериофаги и геномные острова (таблица 1) занимают свое место внутри самой плазмиды с помощью механизмов перестройки и рекомбинации [42].

Таблица 1. Примеры мобильных генетических элементов прокариот и их краткая характеристика.

Вид МГЭ	Краткая характеристика	Графическое изображение
Плазмиды	Двуцепочечные молекулы ДНК, находящиеся вне хромосомы, содержат гены устойчивости к антибиотикам.	
Инсерционные последовательности (IS-элементы)	Небольшие (200-2000 п.н.) участки двухцепочечной ДНК, составе которых только гены, кодирующие белки, необходимые для их перемещения (транспозиции), транспозазы	
Транспозоны (Tn)	Фрагменты ДНК, способные отщепляться с одной части генома и встраиваться в другую ее часть. Содержат гены резистентности к антибиотикам, тяжёлым металлам.	
Бактериофаги, фаги и вироиды	Внеклеточные микроорганизмы, способные размножаться и экспрессировать свои гены только внутри бактериальных клеток.	
Интегроны	Участки двухцепочечной ДНК, входят в состав плазмид или транспозонов, с помощью которых и распространяются. содержат гены устойчивости к	

	антибиотикам	
Интроны	Являются промежуточными фрагментами ДНК.	
Геномные острова	Фрагменты ДНК, могут содержаться в одних штаммах и отсутствовать в других, если даже они принадлежат к одному виду, кодируют факторы патогенности, резистентности к тяжёлым металлам и антибиотикам	

3. 2. 2 Инсерционные последовательности (IS-элементы)

В бактериальных геномах широко распространены инсерционные последовательности или IS-элементы, которые являются мобильными элементами и имеют размер от 0,7 до 2,5 т.п.н. Их наличие играет важную роль в амплификации и экспрессии многих генов [47, 59].

IS-элементы – это сегменты ДНК, которые имеют способность перемещаться от одного участка генома к другому, при этом не теряя своего исходного строения.

Данные элементы содержат только те гены, которые необходимы для их собственного перемещения, а именно - гены транспозиции. На концах IS-элементов находятся инвертированные повторы. Когда IS-элемент встраивается в новый участок, происходит дупликация, вследствие чего IS-элемент окружается дублированной последовательностью.

3. 2. 3 Транспозоны (Tn)

Транспозоны (Tn) – это мобильные генетические элементы, которые перемещаются в пределах одной молекулы ДНК или между различными репликонами одного генома, отсюда и термин универсальный генный

«челнок» или «прыгающий ген». Они широко распространены у прокариот и делятся на два класса: ретротранспозоны и ДНК транспозоны. Существует также большое семейство транспозонов, которое опосредует перенос детерминант устойчивости между бактериальными штаммами [31].

Межклеточный перенос этих мобильных генетических элементов опосредован ферментом транспозазой. Бактериальные транспозоны подразделяются на IS-элементы, сложные и несложные транспозоны и бактериофаги [31].

В настоящее время транспозоны широко изучены у многих организмов и являются важным объектом исследования молекулярной биологии и генетики. Они представляют собой перемещаемые элементы ДНК, которые существуют как независимые внутриклеточные молекулы, а также встроены в гены хозяина. Большинство транспозонов обладают способностью мобилизовать соседние гены, что может привести к изменению фенотипа организма.

Транспозиция может привести к изменению структуры генома, а также включению новых генов, которые ранее не были присутствующими в генетической составляющей клетки. Некоторые из этих генов могут кодировать функции, необходимые для приспособления клетки к среде обитания, такие как устойчивость к антибиотикам. Однако, многие гены, включенные в транспозоны, не связаны напрямую с процессом транспозиции и имеют другие функции. Например, они могут кодировать токсины или ферменты, играющие роль в клеточном метаболизме.

Одним из основных генов, присутствующих в транспозонах, является ген транспозазы, который ответственен за механизмы перемещения транспозона в геноме хозяина. Также часто встречаются гены, кодирующие белки, необходимые для размножения и интеграции транспозона в хозяйскую клетку.

Исследования транспозонов позволяют получить более глубокое понимание организации генома и его эволюции. Кроме того, они имеют большое практическое значение в медицине и сельском хозяйстве, так как

возможность мобилизации генов может использоваться для создания новых видов организмов или для усиления желательных свойств уже существующих.

В научных исследованиях было установлено, что IS-элементы, находящиеся близко друг к другу, могут совместно перемещаться и переносить сегменты ДНК между собой, образуя таким образом транспозон. Транспозоны и IS-элементы являются ключевыми факторами в генетических процессах бактерий. При вставке мобильного элемента в ген, он может привести к инактивации этого гена. Эти процессы имеют большое значение для понимания механизмов генетической изменчивости бактерий и их адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Однако, необходимы дальнейшие исследования для более полного понимания роли транспозонов и IS-элементов в жизненном цикле бактерий и их взаимодействии с геномом. Некоторые IS-элементы и транспозоны могут также вызывать генетическую нестабильность в своих локализованных регионах.

Мобильные элементы ДНК возможным образом взаимодействуют с хромосомами и вызывают в них различные изменения. Одним из подобных изменений является делеция, то есть отсутствие определенного сегмента в определенном месте. Также возможна инверсия, то есть поворот сегментов хромосомы на 180° . Оба типа изменений заметно возрастают вблизи мобильных элементов. Одна из границ перестройки всегда совпадает с одним из концов IS-элемента, либо автономного, либо входящего в состав транспозона.

Рассмотрим более точно транслокации, вызываемые мобильными элементами. Существует два типа транслокации из одного генома в другой. Первый тип, который называется постинтеграцией, подразумевает слияние генома-донора либо с IS-элементом, либо транспозоном, с молекулой ДНК реципиента. Репликация через внутриклеточный механизм репликации удваивает количество мобильных элементов. При репликации мобильных элементов образуются промежуточные коинтегратаы. Продукт гена *tnpR*,

называемый резолвазой, необходим для разделения коинтеграта на отдельные репликоны, один из которых приобретает новую копию мобильного элемента [24].

Простое встраивание является вторым типом транслокации. При этом мобильный элемент перемещается в новый геномный локус, однако не происходит никаких транслокаций, за исключением дублирования целевого сайта. Иногда такой тип транслокации называют консервативной (или нереплицирующейся) транслокацией. Реализация данного процесса требует ограниченного репаративного синтеза ДНК.

В настоящее время широко распространено мнение о том, что мобильные элементы являются одной из ключевых составляющих процесса эволюции бактерий. Медленное накопление мутаций, под действием естественного отбора, не особо эффективно в создании новых генетических функций у бактерий. Наоборот, вставка IS-элементов вблизи генов может обусловить их активацию благодаря транскрипции, вызванной промотором мобильного элемента. Таким образом, регуляция биологических процессов в бактериях может существенно изменяться. Важно отметить, что наряду с этим эффектом, мобильные элементы действуют как гомологичные сайты, способствующие дупликации генов. Это представляет собой один из основных механизмов возникновения новых функций. При этом вырожденные копии генов не испытывают сильного отбора, что способствует накоплению мутаций. Конечно, это может приводить и к потере некоторых функций, но весьма вероятно, что появятся новые гены со своими уникальными свойствами.

Приобретение генов транспозонами может привести к селективному преимуществу клеток. Это связано с генами устойчивости к различным бактериальным токсинам, включая тяжелые металлы и антибиотики. Также возможно приобретение генов дополнительных метаболических путей, обеспечивающих использование необычных источников углерода. Кроме того, транспозоны могут переносить гены специфических токсинов, которые

делают бактерии патогенными и меняют их образ жизни. Плазмиды также могут содержать полезные для клетки-хозяина гены, которые могут находиться в транспозонах. Это открывает возможности для развития эффективных методов генной инженерии. Следовательно, приобретение генов транспозонами является важным механизмом для эволюционного развития клеток и может быть использовано в генной инженерии.

3. 2. 4 Бактериофаги

В науке известны вирусы, которые могут инфицировать только бактерии, оставляя без вреда организм человека или животных. Бактериофаги, так именуются эти вирусы, имеют важную роль в процессе горизонтального переноса генов устойчивости к лекарствам. Результаты исследований подтверждают, что фаги являются важными участниками этого процесса [51, 53]. Перенос генов, ответственных за устойчивость к антибиотикам, происходит при инфицировании бактериофагами. При этом механизме умеренный бактериофаг интегрирует свою ДНК в хромосому рецепторной клетки и может продолжать существовать в спящем состоянии в организме животного до тех пор, пока не появится стрессовая ситуация, принуждающая его покинуть хромосому и запустить механизм образования фаговых частиц и лизиса бактерий. Отличительной особенностью вирулентных бактериофагов является то, что они немедленно превращаются в фаговые частицы и начинают уничтожать клетки хозяина без интеграции своей ДНК в его хромосомы [51].

Многие исследователи считают, что ГПГ может вносить важный вклад в глобальное распространение устойчивости к антибиотикам через фагопосредованную трансдукцию. Многочисленные исследования подтвердили наличие генов устойчивости к антибиотикам в клинических, природных и лабораторных изолятах *E. coli*, связанных с инфекцией бактериофагами [53]. Кроме того, было установлено, что ген SGI1 бактериофага DT104,

окруженный интегронами типа I, участвует в формировании устойчивости к пенталему у *S. typhimurium* [51].

3. 2. 4 Интегроны (In)

Внутриклеточные структуры, названные интегронами, играют важную роль в эволюции бактерий. Они присутствуют в различных генетических элементах, таких как плазмиды, транспозоны, хромосомы, и представляют собой крупное семейство генетических элементов. Исследования показали, что интегроны позволяют бактериям адаптироваться к окружающей среде и выживать в условиях стресса [41, 56].

Одним из важных механизмов, которые обеспечивают интегроны, является захват генов. Гены, которые попадают под действие интегронов, могут быть использованы бактериями в своих жизненных процессах. Однако, интегроны могут продвигать и распространение генов, которые играют роль в появлении устойчивости к антибиотикам, что является серьезной проблемой для медицины [41, 56].

В строении интегронов есть один или несколько промоторов, которые опосредуют захват и экспрессию кассет генов, сегрегированных в гене интегразы *intI*, сайте рекомбинации *attI* и сайте рекомбинации *attC* (рис. 1, а). Они могут быть различной длины и содержать различные гены. Изучение различных структур интегронов помогает понять, как они взаимодействуют с другими элементами генетической системы бактерий и какие последствия это может иметь для их переживания в экологических нишах и в клинических условиях.

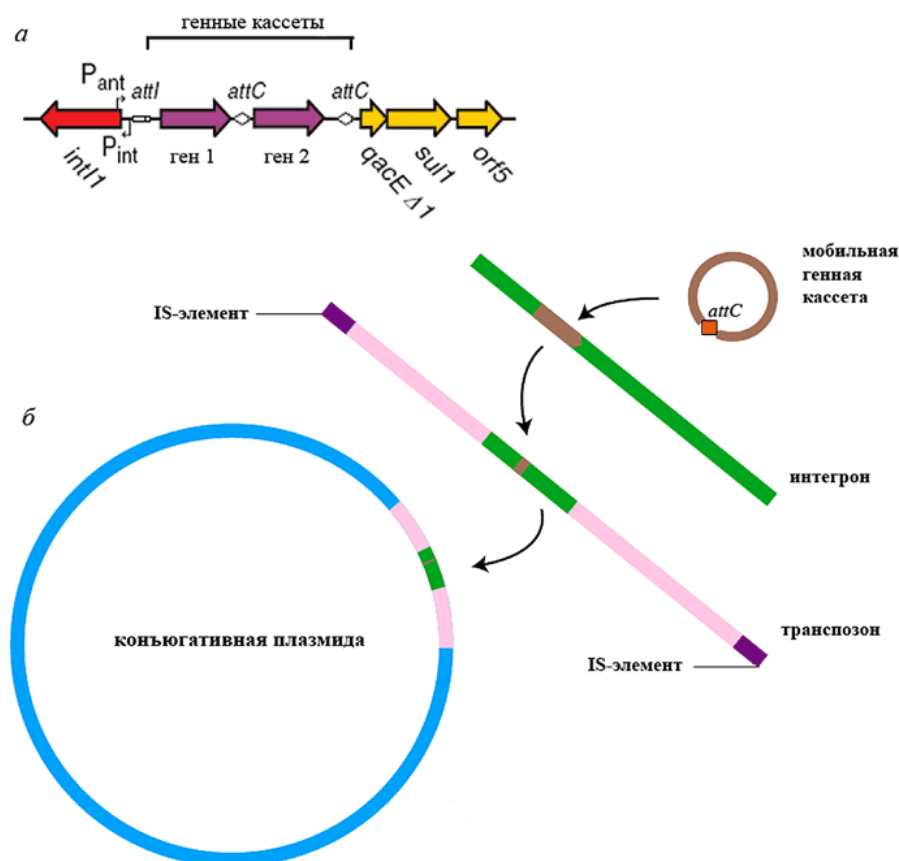


Рисунок 1. Интегрон – ДНК, улавливающая генные кассеты и распространяемая в составе более высокоорганизованных МГЭ. а – Структура интегрона класса 1. P_{int} – промотор интегразы, P_{ant} – промотор кассет антибиотикорезистентности. б – Иерархическая организация МГЭ. (Источник [55] и [30])

Внутри интегрона или при передаче от одного интегрона к другому генные кассеты представлены в виде двухцепочечных замкнутых молекул ДНК, которые действуют как автономные и нереплицирующиеся единицы. Кассеты, поглощаемые интегронами и суперинтегронами, содержат различные гены, такие как гены факторов вирулентности, метаболических путей, детерминанты устойчивости к антибиотикам и дезинфектанту устойчивости. Кроме того, гены ферментов рестрикции также могут быть присутствующими на кассетах генов.

Следовательно, функция интегразы *IntI* заключается в сайт-специфической рекомбинации между *attI* и *attC*, что в свою очередь приводит к включению или удалению кассет. Множественные интеграции, в свою очередь, могут образовать многокассетную серию, где все кассеты фланкированы сайтами *attC*. К числу интересных фактов относится

обнаружение до 179 генных кассет в суперинтегронах на хромосомах *Vibrio cholerae*, в то время как большинство клинически значимых бактерий содержат от пяти до восьми генных кассет. Выявлено, что кассеты, находящиеся ближе к промотору, экспрессируются эффективнее. Однако, изменения в давлении отбора могут способствовать перестройке расположения интегронов.

Все интегроны с кассетами устойчивости к антибиотикам можно разделить на пять классов на основе гомологии последовательности кодируемой ими интегразы. Функция огромного числа кассет, активно транспортируемых в бактериальных популяциях путем рекомбинации (известны химерные интегроны с различными классами модулей, деградации и «захвата» новых кассет интегронами, локализованными МГЭ (рис. 1, б), а не путем «саморазмножения», пока неизвестна [29].

3. 2. 5 Геномные острова

Геномные острова – это фрагменты ДНК, присутствующие в геноме одного штамма и отсутствующие в других, даже в близкородственных штаммах одного вида. Структура «типичного» геномного острова показана на рисунке 2. Геномные острова имеют следующие характеристики:

- 1) размер 10-500 т.п.н.;
- 2) богатый GC состав, большое количество тетрануклеотидов;
- 3) наличие генов, кодирующих интегразу, обеспечивающую вставку ГО в определенные хромосомные участки; избирательная вставка ГО в 1-2 хромосомных участка, отличающая их от конъюгативных транспозонов, которым «не нужны» сайты интеграции [28]. В некоторых случаях ГО остаются прикрепленными к хромосомам хозяина в результате отсутствия или потери генов интегразы;
- 4) во многих случаях островки включают 16-20 п.н. повторы ДНК-матрицы, используемые для вырезания островков;
- 5) наличие IS-элементов и транспозонов [28];

6) геномные играют важную роль в эволюции бактерий и их адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды, кодируя факторы вирулентности, устойчивость к тяжелым металлам и антибиотикам, ферменты, разрушающие ксенобиотики, и т.д. Было высказано предположение, что геномные острова могут резко изменить фенотип хозяина от непатогенного к патогенному или от несимбиотического к симбиотическому, например, путем «квантового скачка». Было высказано предположение, что участие геномных островов было необходимо для того, чтобы микобактерии, которые изначально были сапротрофными и свободноживущими, перешли к паразитическому образу существования [52].

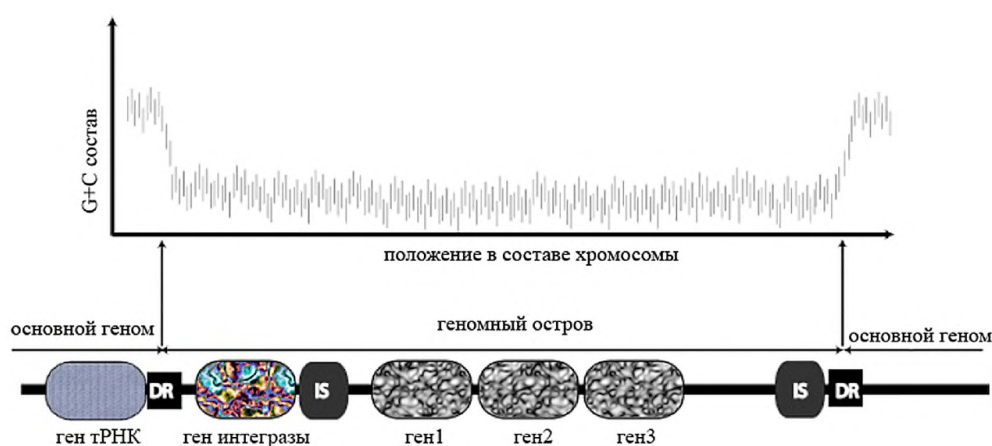


Рисунок 2. Схема структуры геномного острова. DR – прямые повторы, IS – инсерционные элементы. Источник [52]

Часто активация геномных островов происходит в качестве SOS-ответа на повреждение ДНК, вызванное антибиотиками и другими факторами окружающей среды. [52]

3. 3 ICE-элементы

ICE-элементы (интегративные конъюгативные элементы) являются особой группой мобильных генов, которые способны перемещаться путем конъюгации и интеграции в хромосому хозяина. Они представляют собой один из типов самотранслирующихся элементов, подобных конъюгативным плазмидам. Однако ICE-элементы не имеют возможности репликации самостоятельно [65, 37]. Подобно умеренным бактериофагам, ICE-элементы

интегрируются в хромосому хозяина и реплицируются вместе с ней. Они включают в себя набор генов для конъюгативного переноса и систем контроля, которые обеспечивают удаление элементов и их интеграцию в хромосому. ICE-элементы действуют как мобилизующий фактор для других генетических элементов, что способствует переносу детерминант вирулентности, устойчивости к антибиотикам и других факторов. Различные механизмы регулирования ICE помогают поддерживать генетическую стабильность и управлять их передачей от одного организма к другому [46, 37].

Изучение ICE-элементов играет важную роль в понимании механизмов горизонтального переноса генов и распространения антибиотикорезистентности среди бактериальных сообществ. Поэтому, более детальное исследование ICE-элементов необходимо не только для повышения понимания бактериальной эволюции, но и для разработки эффективных методов борьбы с инфекционными заболеваниями и различными другими проблемами, связанными с бактериальной устойчивостью.

ICE-последовательности – это набор генов, предположительно полученных от плазмид или фагов и неизвестного происхождения [33].

ICE-элементы, наиболее известные как интегративные и конъюгативные элементы мобильности, являются важными объектами исследования в генетике микроорганизмов. Изучение консервативных последовательностей данных элементов выявило существование генов, ответственных за интеграцию, расщепление, конъюгативный перенос и регуляторные процессы [33]. В состав ICE-элементов входят вариабельные ДНК-локусы, придающие им неординарные свойства.

Вариабельные последовательности размером примерно от 30 до 60 п.н. преимущественно присутствуют в пяти горячих точках, показывающих наибольшую изменчивость элементов. Тем не менее, некоторые ICE-элементы также содержат вариабельную ДНК, встроенную в четыре вариабельные области (Vr) вне пяти горячих точек [4]. Вариабельная ДНК ICE-элементов

насчитывает функции, связанные с устойчивостью к антибиотикам и тяжелым металлам, контролем образования биопленок и подвижностью. Изучение этих функций позволяет не только разрабатывать новые методы борьбы со вредными микроорганизмами, но и дает возможность более глубоко понимать принципы эволюции геномов [34].

ICE-это передающиеся элементы, которые участвуют в горизонтальном переносе генов между бактериальными популяциями. Обычно ICE имеют модульную структуру, в которой гены определенных функциональных групп классифицируются в кластеры. В процессе передачи ICE возникает вырезание из хромосомы хозяина и образование внехромосомного циркулирующего замкнутого промежуточного звена, которое переносится в нового хозяина. Как правило, 5'-конец интегрированных ICE содержит гены устойчивости к антибиотикам, а 3'-конец содержит гены, ответственные за транслокацию и белки для контроля транслокации ICE, но не для автономной репликации [63]. Однако, значительное число кодирующих последовательностей ICE не имеют определенной функции. Гены интегразы локализованы на 5' конце ICE. Интеграза отвечает за вставку и вырезание элементов одним из видов бактериофага лямбда.

4. Изменчивость штаммов бактерий: внутренняя рекомбинационная активность и горизонтальный перенос генов

Есть три вида рекомбинации, с помощью которых происходит встраивание чужеродной ДНК-последовательности. Это гомологичная, сайт-специфическая и незаконная рекомбинации.

Взаимодействие бактерий на генетическом уровне может быть обусловлено разнообразными элементами генетических наборов и активности, которые влияют на уровень способности к горизонтальному переносу генов у отдельных видов и штаммов бактерий. Процесс гомологичной рекомбинации является важнейшим механизмом горизонтального переноса генов, его эффективность зависит от степени гомологии и протяженности гомологичных

участков ДНК, а также наличия специфических белков, ответственных за инициацию и поддержание процесса рекомбинации. Потенциал межвидовой генетической трансформации также является функцией этих параметров, что может приводить к замене эндогенных генов и фрагментов последовательностей донорской ДНК. Особое внимание на генетическое взаимодействие уделено мутантным клеткам, имеющим дефекты в системе репарации неспаренных оснований (mismatch repair, MMR), так как способность к межвидовой гомологичной рекомбинации в таких клетках значительно выше, по сравнению с обычными клетками [50].

Влияние гомологичной рекомбинации на эффективность зависит не только от функции системы MMR, но и от системы SOS-репарации, которая осуществляет коррекцию «несоответствующих» оснований при участии индуцибельных ДНК-полимераз. Данные полимеразы действуют с низкой точностью на некомплементарную матрицу, что снижает вероятность рекомбинации геномов. Однако, соотношение активности системы SOS и MMR контролирует вероятность рекомбинации между негомологичными геномами. Комбинация минимальной активности MMR и индукции системы SOS выравнивает ограничения на рекомбинацию между дивергентными последовательностями, что в свою очередь повышает вероятность реализации гомологичной перестройки генома. В свете вышеперечисленных факторов, определение соотношения между активностью MMR и SOS становится крайне важным для правильного прогнозирования эффективности гомологичной рекомбинации и, как следствие, успешной перестройки генома [62]

Системы гомологичной рекомбинации - это не только мощный инструмент замены геномных участков и увеличения полиморфизма, но и источник новых последовательностей ДНК. Механизм включает взаимодействие между линейной молекулой донорской ДНК и хромосомой, которая содержит сайт инициации гомологичной рекомбинации, что позволяет присоединить негомологичные геномные сегменты. Процесс облегчается системами гомологичной рекомбинации, которые расширяют область

рекомбинации и включают соседние последовательности донорской ДНК [54]. Негомологичная рекомбинация, хоть и редко встречающаяся, считается одним из истинных механизмов реализации.

Высокий уровень гомологичной рекомбинации должен рассматриваться как основная причина аллельных расхождений во время филогенетического мультилокусного анализа геномов. Мутации в качестве причины, наоборот, не являются такими существенными. Соответственно, бактерии с низкой клональностью, при которых происходит интенсивный рост горизонтального переноса генов, обычно характеризуются высоким уровнем гомологичной рекомбинации. Виды, в которых рекомбинационные события редки, характеризуются низкой клональной стабильностью и ограниченными возможностями для роста ГПГ. Сайт-специфическая рекомбинация происходит только в тех областях генома, где представлены уникальные участки, как правило, маленькие как по размеру, так и по количеству копий, где мобильные элементы смогут взаимодействовать. Однако в отличие от гомологичной рекомбинации, сайт-специфическая рекомбинация происходит только в тех конкретных областях, которые содержат указанные уникальные участки.

Встраивание мобильных элементов в хромосомы бактерий может привести к рекомбинации между гомологичными последовательностями, внедренными в клетку через горизонтальный перенос генов. Некоторые штаммы бактерий не имеют генов, кодирующих транспозиционные ферменты или сайт-специфические рекомбиназы, в то время как у многих факультативных внутриклеточных бактерий есть сильные транслокационные системы, управляющие мутагенезом, экспрессией генов и реорганизацией генома. По этой причине такие бактерии могут значительно влиять на горизонтальный перенос генов и генетическую диверсификацию. [35]

Многочисленные исследования показывают, что в геноме живых организмов происходит множество механизмов, включая сайт-специфическую и незаконную рекомбинацию. В отличие от сайт-специфической

рекомбинации, которая происходит в строго определенных местах генома, незаконная рекомбинация может совершаться в различных случайных областях генома. Одним из механизмов несанкционированной рекомбинации является образование двунитевых разрывов и их последующее связывание с фрагментами ДНК, содержащими негомологичные гены [48]. Этот процесс поддерживается специфическими белками и может быть крайне редким, поскольку высокая частота образования двунитевых разрывов сопровождается гибелью клеток. Тем не менее, в последнее время была продемонстрирована инновационная ценность незаконной рекомбинации для проведения генетических процедур обмена генетической информацией между генетически удаленными донорами. Перспектива открытия возможности проведения горизонтального переноса генов от таких доноров является весьма привлекательной и требует дальнейшего исследования [54].

Важными механизмами, обеспечивающими горизонтальный перенос генов между бактериями, являются трансдукция, конъюгация и трансформация. Эти механизмы позволяют бактериям обмениваться плазмидами и мобильными элементами. Однако именно трансдукция является ключевым механизмом в эволюции прокариотических геномов.

Таким образом, трансдукция является важным механизмом в эволюции прокариотических геномов, а бактериофаги играют важную роль в передаче генов между бактериями, особенно в условиях окружающей среды, захватывая части бактериального генома, а затем инфицируя другие бактерии этими последовательностями [2, 58]. Плазмиды и транспозоны, в свою очередь, менее стабильны, и могут играть второстепенную роль в горизонтальном переносе генов [49].

Некоторые виды бактерий используют горизонтальный перенос генетического материала с помощью механизма конъюгации. В этом процессе грамотрицательные бактерии используют систему секреции IV типа, которая позволяет им образовывать пили для межклеточных контактов. Но определенные микроорганизмы образуют контакты не только между своими

видами, но и с клетками других видов, включая как эукариотические, так и прокариотические клетки [61].

Существует несколько механизмов передачи генетического материала между грамположительными бактериями, и одним из них является трансформация. Этот процесс включает в себя выделение и стабилизацию внеклеточной ДНК, а также способность компетентных клеток обработать и интегрировать эту ДНК [61].

Одним из ключевых факторов, определяющих возможность проведения процесса трансформации у бактерий, является наличие компетентных клеток. К этому понятию относится способность клеток принимать чужеродную ДНК из окружающей среды. Компетентность может присутствовать у многих различных видов бактерий и архей, в том числе у клинических изолятов. Однако, режим компетентности у этих видов разнится и может быть обусловлен различными условиями (плотность клеток, доступ к питательным веществам). Кроме того, необходимы определенные белки для обработки и стабилизации внешней ДНК. Область компетентности может составлять от нуля до практически всех клеток в популяции [34].

Широкий спектр условий и факторов могут влиять на возможность достижения этого состояния. Однако, учитывая наличие природной компетентности у многих бактерий, этот механизм переноса генетического материала может иметь важное значение для понимания механизмов эволюции и приспособления бактерий к переменным условиям среды.

В бактериях грамположительных видах выделяют две группы генов: ранние гены, которые кодируют белки, обеспечивающие статус компетентности и поздние гены, продукты которых важны для связывания ДНК, ее транспортировки и рекомбинации. Грамотрицательные бактерии же формируют пили через систему секреции IV типа, при помощи которой происходит поглощение ДНК. Кроме того, эксперименты подтвердили, что компетентность в бактериях активируется при наличии антибиотиков [39].

В качестве источника ДНК для трансформации бактерий может выступать материал из разрушенных бактериальных клеток или вирусных частиц. Для многих видов бактерий характерно активное высвобождение ДНК из живых клеток. ДНК присутствует в почве, воде, пище, кормах и грязи. Трансформация бактерий является распространенным феноменом, обусловленным наличием ДНК в окружающей среде и специфическими механизмами ее переноса внутрь клетки. Результаты последних исследований определяют значение компетентности и формирования пилей в процессе трансформации и открывают перспективы для создания новых методов генной инженерии [61].

Взаимовлияние генетической информации разных организмов нередко подвержено ограничениям горизонтального переноса генов, вызываемыми наличием межвидовых барьеров. Такие барьеры могут возникать вследствие поверхностного исключения или различных систем рестрикции-модификации, а также ограничения репликации плазмид. Однако поверхностное исключение не обязательно препятствует переносу плазмид, а наоборот, может способствовать передаче генной информации, освобождая реципиента для передачи плазмиды новому потенциальному реципиенту [61]. У различных организмов могут быть разные системы рестрикции-модификации, и они не всегда создают межвидовые барьеры для переноса плазмид. Кроме того, барьеры репликации плазмид связанные с совместимостью системы репликации плазмиды с белками хозяина также не всегда ограничивают перенос плазмид во многих регионах хозяина. Широкий круг хозяев может использовать более гибкие системы репликации, допускающие рекрутирование белков хозяина и позволяющие успешный перенос плазмид.

Исследования показывают, что механизмы горизонтального переноса ДНК у различных видов бактерий не единообразны. Это разнообразие механизмов ставит ограничения на возможность переноса между видами, поглощения и стабилизации иностранной ДНК в бактериях [61].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2. 1 Объекты исследования

Объектами исследования служили лабораторные штаммы *E. coli* XL-Blue, трансформированные рекомбинантными плазмидами pJN105TurboGFP и pJN105TurboRFP. Дикие штаммы клубеньковых бактерий *R. leguminosarum* ГЛЗ, *R. leguminosarum* ГЛ9 *Sinorhizobium meliloti* Mlu10.

2. 2. Методы исследования

2.2.1. Приготовление питательных сред для культивирования бактерий

Таблица 2 Составы использованных стандартных водных растворов

Раствор	Реактивы
Среда YM	маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), MgSO ₄ (0,01%), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (0,05%), CaCl ₂ (30%)
Агаризованная среда YM	маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), MgSO ₄ (0,01%), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (0,05%), CaCl ₂ (30%), агар-агар (2%)
Среда Lb	1% бактопептон, 0,1% дрожжевой экстракт, 0,01% NaCl)
Агаризованная среда Lb	1% бактопептон, 0,1% дрожжевой экстракт, 0,01% NaCl), агар-агар (2%)

Жидкие среды без агара, твердые с 2% агаром

Сухие компоненты растворяли в дистиллированной воде. Стерилизовали питательную среду в автоклаве при 121°C в течение 30 мин.

2.2.2. Культивирование бактерий в жидких и твердых средах

Жидкие среды стерилизовались в 50 мл колбах, после остывания в них добавляли гентамицин и производили посев бактерий. Для этого прокаленной бактериологической петлей вносили небольшое количество бактериальной массы в колбу. Затем колбы инкубировали в термостатируемом шейкере ES-20 (BioSan, Латвия) при 28°C в течение 1-2 суток.

После стерилизации твердые питательные среды разливали в Чашкам Петри по 25-30 мл и ждали их полного застывания. Прежде чем производить посев, 8 мкл суспензии бактерий с жидких сред разводили в 1,5 мл стерильной воды. Затем с помощью дозатора со стерильными наконечниками отбирали необходимый объем и наносили на поверхность питательной среды 20 мкл разведённых бактерий, стерильным охлажденным шпателем осторожными круговыми движениями равномерно распределяли материал по всей поверхности чашки Петри.

Работу проводили в боксе микробиологической безопасности БМБ-II «Ламинар-С»-1,2. Бактерии инкубировали в термостате при 28°C (*R. leguminosarum*) или 37°C (*E. coli.*) в течение 1-2 суток.

2.2.3. Подготовка бактерий к криохраниению

В пробирки объемом 1,5 мл 800 мкл добавляли суспензии бактерий с жидких сред и с помощью дозатора со стерильными наконечниками вносили 20 мкл 30% глицерин. Затем перемешивали содержимое пробирок на вортексе и отправляли в морозильную камеру при -72°C

2.2.4. Оживление штаммов бактерий после криохраниения

Штаммы бактерий хранились в морозильной камере при -72°C. В качестве криопротектора 30% глицерин. Для оживления пробирки с бактериями помещали в замороженный штатив. Затем с помощью дозатора со стерильными наконечниками отбирали необходимый объем замороженных клеток и наносили

на твердую питательную среду Ym (*R. leguminosarum*) или Lb (*E. coli.*). После чего размазывали простерилизованным в пламени горелки бактериологическим шпателем. Работу проводили в боксе микробиологической безопасности БМБ-II «Ламинар-С»-1,2. Бактерии инкубировали в термостате при 28°C (*R. leguminosarum*) или 37°C (*E. coli.*) в течение 1-2 суток. По окончании инкубации проводили подсчет колоний.

2.2.5. Выделение ДНК из бактерий

В ходе проведения исследования был использован метод лизирования клеток для выделения ДНК. Для этого брали необходимое количество бактериальной массы прокаленной бактериологической петлей и наносили на стенки 1,5 мл пробирки. Затем добавляли 150 мкл суспензии Chelex100, перемешивали на вортексе, после чего производили инкубирование при температуре 95°C в течение 10 минут. Затем осаждали клеточные остатки в центрифуге MiniSpinPlus (Eppendorf, Германия) 2 минуты при 13 тыс об/мин. Надосадочная жидкость, содержащая ДНК, использовалась для дальнейшего изучения и постановки ПЦР.

2.2.6. Постановка полимеразной цепной реакции

Расчет компонентов на один образец. Концентрация праймера 10 мкМ

- 1) ТАЕ-буфер 2,5 мкл
- 2) dNTP 2,5 мкл
- 3) праймер 1 мкл
- 4) Taq-полимераза 0,5 мкл
- 5) дистиллированная вода 14,5 мкл
- 6) ДНК 3 мкл

Данные компоненты раскапывали по стенкам пробирки, затем дистиллированной водой «смывали» капли со стенок, смешивая все. В последнюю очередь добавляли ДНК. В исследовании использовались праймеры

GFOR и GREV, RFOR и RREV для проведения ПЦР. С целью избегания испарения жидкости на поверхности каждой реакционной смеси, было добавлено 20 мкл минерального масла. ПЦР проводилась на амплификаторах MC2 «Терцик» компании «ДНК-технология» (Россия). Первоначально производилась денатурация ДНК при 95°C, за которой следовало 30 циклов амплификации. Каждый цикл включал в себя стадию денатурации ДНК в течение 30 секунд при 95°C, отжиг праймеров продолжительностью 40 секунд при температуре от 33°C до 53°C и стадию элонгации в течение 1 минуты 20 секунд при температуре 72°C, которая была оптимальна для активности Taq-полимеразы. На заключительной стадии реакционная смесь выдерживалась при температуре 72°C в течение 2 минут для завершения построения комплементарных цепей фрагментов ДНК и исключения копий, содержащих не полностью достроенные молекулы.

2.2.7. Приготовление 1% агарозного геля для электрофореза

Прежде чем провести электрофоретическое разделение исследуемой ДНК, необходимо было приготовить агарозный гель. Для этого в мерную колбу объемом 250 мл добавляли 1 г агарозы, 2 мл ТАЕ-буфера и 100 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы отправляли в микроволновку для расплавления агарозы, каждые 30 секунд вынимая колбу и перемешивая до тех пор, пока мелкие частицы агарозы не растворятся полностью.

Далее размещали столик для заливки геля на плоскую поверхность и выравнивали его с помощью небольшого уровня. Заливали расплавленный гель, устанавливали гребенки толщиной 1,5 мм с зубчиками шириной 3-8 мм, отступив от краев столика на 5 мм – 1 см и 2 – 5 мм от дна столика.

2.2.8. Электрофорез в агарозном геле

В данном исследовании был проведен процесс электрофоретического фракционирования препаратов ДНК в геле на основе агарозы с содержанием 1%. В качестве источников питания использовались приборы модели 250/2.5

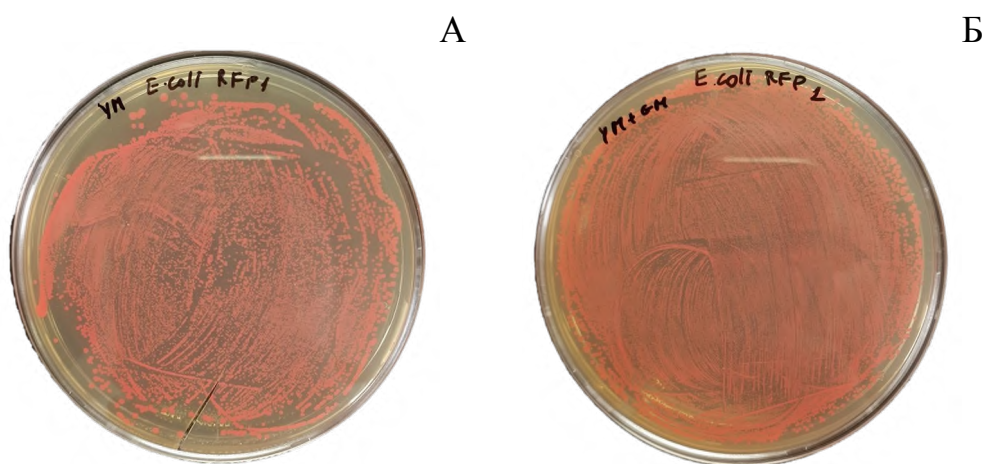
фирмы Bio Rad (США) или модели «Эльф-4» фирмы ДНК-технология (Россия). В качестве буферной системы использовали ТАЕ-буфер. После окончания электрофореза ДНК в гелях окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 10 минут. Регистрацию флуоресценции нуклеиновых кислот проводили при помощи трансиллюминатора и специальной фотодокументационной системы фирмы UVP (США) в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был сделан значительный шаг к исключению «потери штаммов» при хранении микроорганизмов. Не смотря на огромные плюсы данного метода он не лишен недостатков. В данной работе мы не касались технических моментов методики и остановились на биологических процессах. Нас интересовало, что происходит с геномом бактерий после долгосрочного хранения способом криоконсервации. С целью выявить изменения геномов бактерий после долгосрочного хранения нами были поставлены опыты с использованием лабораторных штаммов бактерий *E. coli* штамма XL-blue, имеющие генотип *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]* у которых как видно из описания отключены гены участвующие в рекомбинационных процессах и репарации, а также дикие штаммы ризобий, которые наоборот характеризуются высокой рекомбинационной активностью как за счет внутренней рекомбинации, так и за счет горизонтального переноса генов. Для выявления процессов потери генов исследуемые бактерии были трансформированы плазмидами несущими маркерные гены. Один из маркеров, являющийся геном антибиотикоустойчивости можно было селективировать за счет добавления антибиотика в среду, второй маркер представлял из себя ген флуоресцентного белка, и не был подвержен селекции. Для этого были получены электрокомпетентные клетки исследуемых штаммов бактерий и методом электропорации были получены их трансформированные рекомбинантные формы. Для трансформации были использованы плазмиды широкого круга хозяев pJN105TurboGFP и pJN105TurboRFP для внедрения в

бактерии *E. coli* и штаммы ризобий, отличающиеся между собой наличием в своем составе генов разных флуоресцентных белков. Селекцию рекомбинантов проводили на селектирующей агаризованной среде, содержащими антибиотик гентамицин. Таким образом были получены штаммы, маркированные красным и зеленым флуоресцентным белком и несущие гены антибиотикоустойчивости к антибиотику гентамицину. Оба маркера изначально были локализованы на привносимой плазмиде.

Для выявления влияния на потерю маркеров бактериями процесса криохранения нами вначале был проведен опыт, при котором бактерии выращивали в жидкой среде и после высевали на чашки с селектирующим антибиотиком и без. Было выявлено, что ни в случае *E. coli*, ни в случае *R. leguminosarum* существенной разницы в количестве выросших колоний как на среде с антибиотиком, так и без не обнаруживается. Что говорит о наличии в клетках гена антибиотикоустойчивости. О наличии у бактерий гена флуоресцентного белка свидетельствует красный и зеленый окрас колоний у *E. coli* и *R. leguminosarum* соответственно.



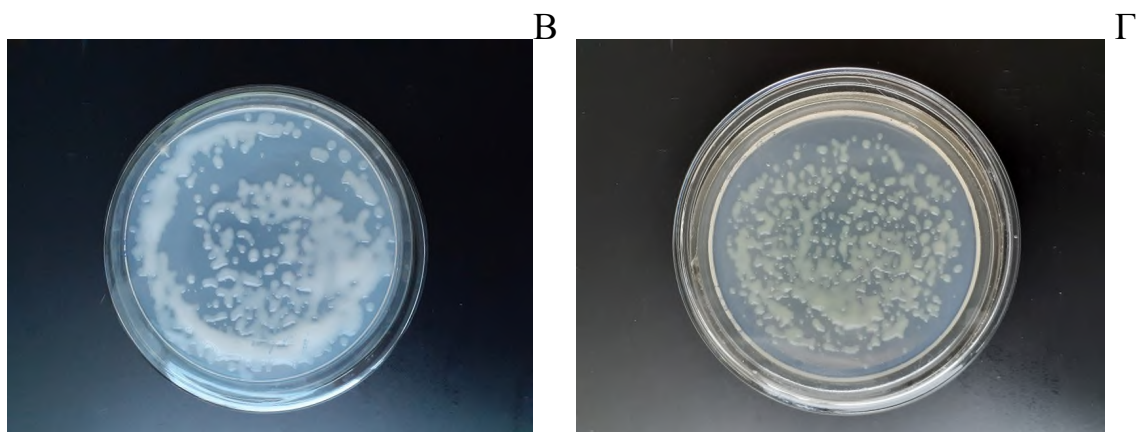
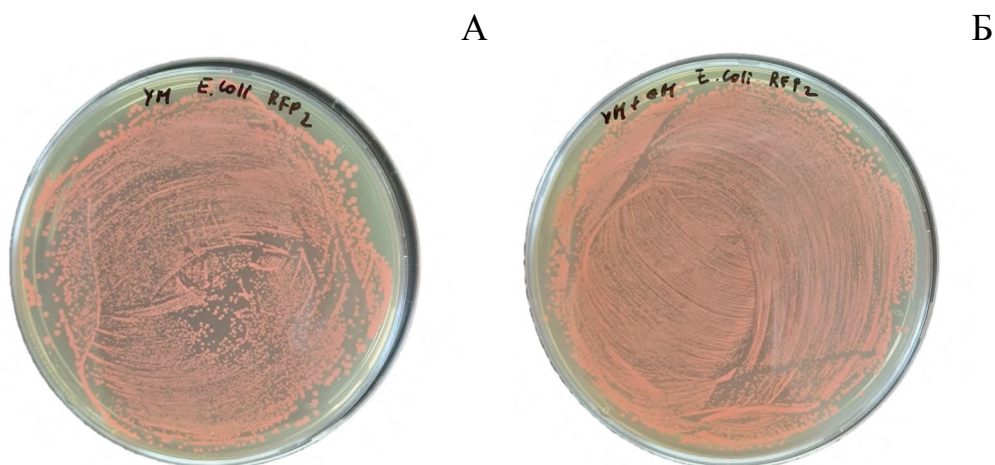


Рисунок 3. Трансформированные плазмидами pJN105TurboGFP и pJN105TurboRFP штаммы бактерий. А, Б – *E.coli* трансформированные плазмидой pJN105TurboRFP, А – среда без антибиотика, Б – среда с антибиотиком; В,Г – *R.leguminosarum* трансформированные pJN105TurboGFP, В – среда без антибиотика, Г – среда с антибиотиком.

Далее бактерии были заложены на криоконсервацию. После 10-ти дней хранения бактерии были регенерированы с использованием твердой питательной среды как с содержанием антибиотика, так и без нее.

При этом были получены следующие результаты. Было выявлено, что лабораторные штаммы *E. coli* XL-Blue после периода криохранения не потеряли плазмиду и она в неизменном виде сохранилась у них в геноме. Об этом свидетельствуют результаты, демонстрирующие отсутствие разницы количества колоний как на среде с антибиотиком, так и без. Кроме того, бактерии не потеряли и свойства нарабатывать флуоресцентные белки, о чем свидетельствует наличие окраса колоний.



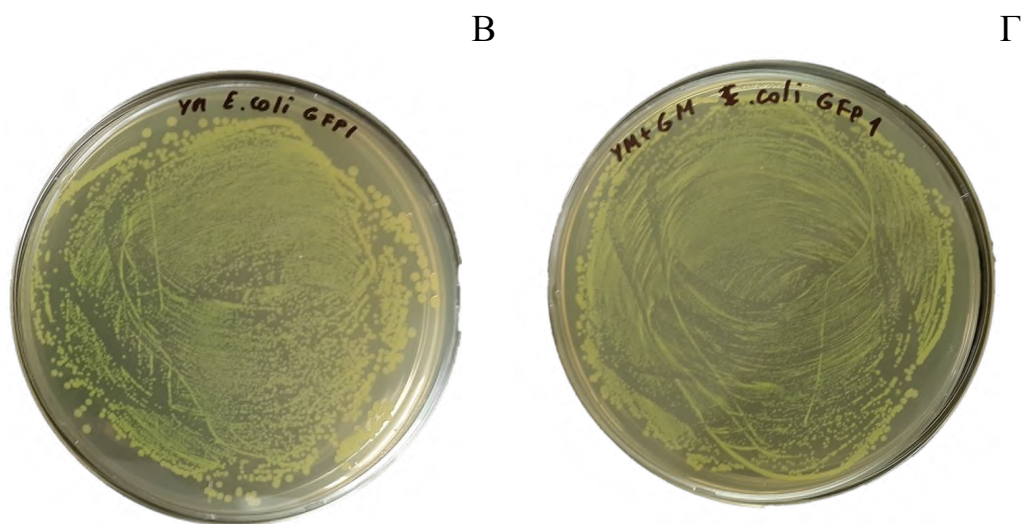
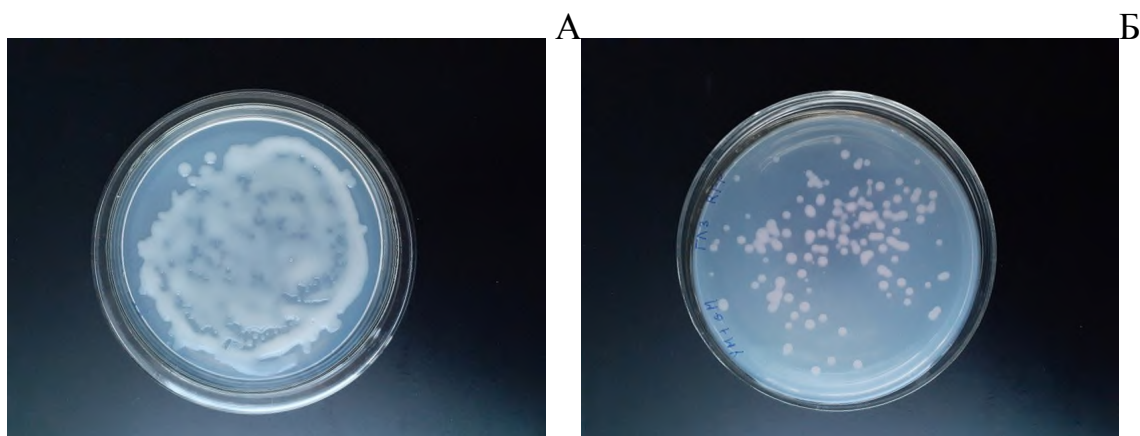


Рисунок 4. Маркированные штаммы *E.coli* засеянные после криоконсервации. А,В – среда без антибиотика; Б,Г – среда с антибиотиком.

Другая картина наблюдалась при регенерации штаммов клубеньковых бактерий. Во-первых, в глаза сразу бросается разное количество колоний, регенерированных на питательной среде без антибиотика и с его содержанием. Это может свидетельствовать, что у части бактерий при регенерации произошла элиминация привнесенной плазмиды, что привело к потере устойчивости у этих клеток к гентамицину. Такие клетки не имели возможности прорасти на селективной среде и это привело к меньшему количеству колоний по сравнению со средой без антибиотика, где проросли и те, и другие варианты.



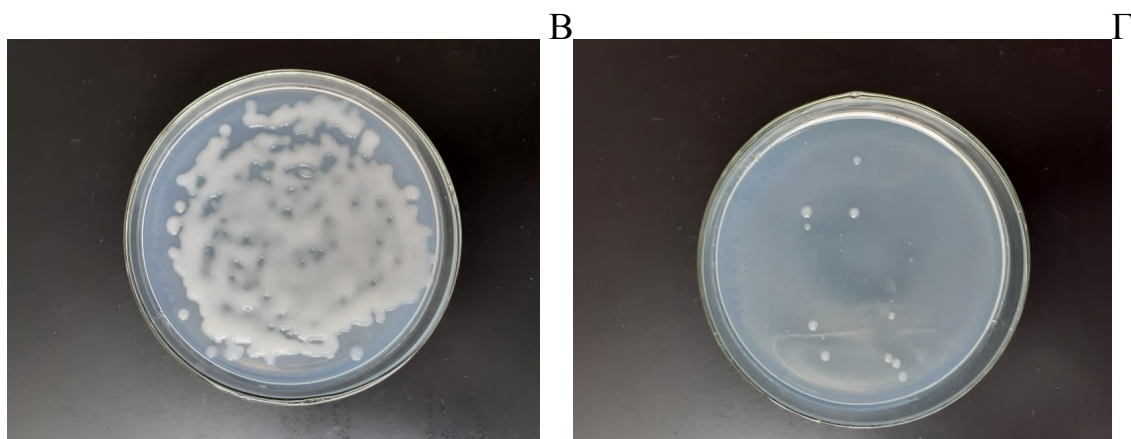


Рисунок 5. Маркированные штаммы *R.leguminosarum* ГЛЗ, высеянные после криоконсервации. А и В – среда без антибиотика; Б и Г – среда с антибиотиком.

Кроме того, обнаруживается также и потеря цвета бактериальных колоний. Если на среде без антибиотика это можно объяснить элиминацией плазмиды, то отсутствие окраса на среде с антибиотиком этим объяснить не получается, поскольку бактерии не потеряли свою антибиотикорезистентность.



Рисунок 6. Пересаженные колонии *R.leguminosarum* ГЛЗ после раунда криоконсервации на среду с антибиотиком.

Это может произойти вследствие нарушения экспрессии гена флуоресцентного белка из-за мутаций или других изменений генома или же за счет потери гена в целом. Для проверки последнего предположения из белых

колоний, выросших на среде с антибиотиком, нами была выделена ДНК и поставлен ПЦР-анализ на наличие в клетках гена флуоресцентного белка.



Рисунок 7. Фореграмма ПЦР анализа наличия гена зеленого флуоресцентного белка в ДНК маркированных штаммов бактерий *R.leguminosarum* ГЛЗ после криоконсервации, потерявших зеленый окрас.

Было показано, что из 9-ти взятых в анализ клонов искомый ген обнаружен только в одном. Это говорит о том, что в остальных 8-ми колониях клетки искомый ген не содержат, хотя у них присутствует ген антибиотикорезистентности. Скорее всего, в клетках данных колоний произошла генетическая рекомбинация, при котором исходная плазмида, содержащая оба маркера, фрагментарно перешла в состав других репликонов, и поскольку селекция велась именно по гену антибиотикорезистентности, то на чашке выросли только содержащие данный признак. Вероятно, в ходе рекомбинации образовались и обратные варианты с геном флуоресцентных белков, но без антибиотикорезистентности, но мы их не обнаруживаем, поскольку по ним не происходит селекции.

Потеря штаммов в процессе хранения является большой проблемой для всей микробиологической науки. В данной работе нами было исследовано

влияние очень распространенного на сегодняшний день способа криохранения на неизменность свойств закладываемых на сохранение культур бактерий. Нами обнаружено, что причиной изменения свойств бактерий, возникающий после регенерации является рекомбинационный процесс, который активируется, скорее всего, у бактерий вследствие стресса, которую они испытывают при заморозке. Лабораторные бактерии *E. coli*, не имеющие возможности рекомбинировать по причине отсутствия у них необходимых для этого генов, не проявляют изменчивости при регенерации их после криоконсервации, а у диких штаммов ризобий это происходит довольно активно.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что при регенерации после криоконсервации у бактерий возможно изменение фенотипических проявлений в следствии изменений в геноме

2. Основной причиной потери маркерных признаков является элиминация плазмиды

3. Выявлено, что изменения в геноме бактерий происходит наряду с элиминацией плазмид также за счет рекомбинационных процессов, приводящих к потере только одного из маркеров.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Коллекции микроорганизмов, их использование и развитие / К. Х. Алмагамбетов[и др.]// Микробиология. Вып.7. 2014. С. 16-20
2. База данных природных и трансгенных светящихся микроорганизмов: «Biolumbase» / Медведева С.Е. [и др.]. Красноярск, 2011. 7 с.
3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. Киев, 1994. 433 с.
4. Бизет Ш., Клермонт Д., Беннет Ф. Биологический ресурсный центр института Пастера. Париж, 2016. 4-7 с.
5. Бузолева Л. С. Некультивируемые формы бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* при периодическом культивировании. М., 2000. 447с.
6. Богатырева М.А. Депонирование клеточных культур микро- и макроорганизмов: основные проблемы и условия. М., 2016. С. 49-55
7. Герна Р. Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии / под ред. Ф.Герхардта [и др.]. Т1. М., 1983. 536 с.
8. Голубовский Михаил Д. Нестабильность генов и мобильные элементы: к истории изучения и открытия // Историко-биологические исследования. 2011. №4, ст. 60-78 URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nestabilnost-genov-i-mobilnye-elementy-k-istorii-izucheniya-i-otkrytiya>
9. Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология. М., 2010. 464с.
10. Ившина И.Б. Специализированный центр микробиологических ресурсов на Урале: становление, проблемы, реализация потенциала, оценка перспектив. Пермь.2016. С. 15-17
11. Калакуцкий Л.В., Озерская С.М. Биологические ресурсные центры: современное состояние в России и мире, проблемы организации, перспективы развития. М., 2011. С. 28-40
12. Калакуцкий Л.В. Доклад на МВК по биотехнологии. М., 2003. С. 25-30
13. Каменских Т.Н. Консервация и гарантированное сохранение родококков *ex situ*. Пермь, 1998. 20 с.

14. Кони́чев А.С., Молекулярная биология./ Кони́чев А.С / – М.:Издательский центр Академия, 2005-400 с.
15. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. [б.м.], 2011.842-846 с.
16. Озерская С. М. Грибы в коллекциях культур: фундаментальные и прикладные аспекты. М., 2012. 47 с.
17. [Охапкина В. Ю.](#), Шабалин Б. А. Методы поддержания микробных культур. Часть I Криоконсервация // Теоретическая и прикладная экология. М., 2009. С. 18-27
18. Похиленко В. Д., Баранов А. М., Детушев К. В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции их развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки 2009. №4(12). С. 99-121.
19. Пушкарёв Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. Киев, 1975. 344 с.
20. Савкина О. А., Терновский Г. В., Локачук М. Н. Криоконсервация – перспективный метод хранения промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей // Сельскохозяйственная биология, вып. 4, 2014. С. 112-119
21. Сафронова В. И., Оследкин Ю. С. Методы консервации коллекционных культур микроорганизмов. СПб, 2007. 21с.
22. Сидорчук А. А., Краснова А. А. Сохранность культур бактерий различных групп при длительном хранении в лиофилизированном состоянии. М., 2016. С. 22-25
23. Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов. Пущино, 1985. 63 с.
24. Современное естествознание. Энциклопедия./Ю.П.Алтухова./ – М.:Магистр-Пресс, 2000.-343 с.
25. Уткина Е.А., Гаврилова Е.Н. , Скородумова О.П. Депонирование штаммов микроорганизмов для целей национальной патентной

- процедуры и предоставления к ним доступа третьим лицам М., 2008.С.17-23
26. Хесин Р.Б., Непостоянство генома./ Хесин Р.Б /. – М.:Наука, 1984.-472 с.
27. Червякова Н. С., Валова Т. В., Осин А. В. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, 2016. С. -68
28. A. Mark Osborn, Dietmar Böltner. (2002). When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid*. **48**, 202-212
- 29.A.C. Fluit, F.-J. Schmitz. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*. **10**, 272-288
- 30.Andreas Schlüter, Rafael Szczepanowski, Alfred Pühler, Eva M. Top. (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev*. **31**, 449-477
- 31.Babakhani S., Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol*. 2018; 58 (11): 905917. doi: 10.1002/jobm.201800204
- 32.Bacterial culture collection: Their importance to biotechnology and microbiology / K. A. Malik, D. Claus // *Biotech. and Genetic Engenering Rev*. 1987. Vol. 5. P. 137–197.
- 33.Beaber J., hochhut B., Waldor M. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholera*. *J. Bacteriol*. 2002; 184(15): 4259–69.
- 34.Bordeleau e., Brouillette e., robichaud n., Burrus V. Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the sXt/r391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-diGMP signalling in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol*. 2010; 12(2): 510–23.

35. Bordenstein S. R. Mobile DNA in obligate intracellular bacteria / Bordenstein S. R., Reznikoff W. S. // *Nature Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 688–699.
36. BRIDGES B. A. Preservation of microorganisms at low temperature // *Laboratory Practice.* 1966. P. 418-222
37. Burrus V., Waldor M. shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 2004; 155(5): 376–86.
38. Cairns J. (1963) The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.* 6, 208–213
39. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS one.* 2011;6(3): e17549. doi: 10.1371/journal.pone.0017549.46.
40. Culture collections and the preservation of bacteria / Lapage S.P., Shelton J. E., Mitchell T. G. // *Methods of microbiology.* 1970. Vol. 31. P. 135-228.
41. Cury J., Jové T., Touchon M., Néron B., Rocha E.P. Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (10): 45394550. doi:10.1093/nar/gkw319
42. Douard G., Praud K., Cloeckaert A., Doublet B. The Salmonella genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *PLoS One.* 2010; 5 (12): e15302. doi: 10.1371/journal.pone.0015302.
43. Flannagan SE, Clewell DB. Identification and characterization of genes encoding sex pheromone cAM373 activity in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *mol microbiol.* 2002;44(3):803-817. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02922.x.
44. Ghaly T.M., Gillings M.R. New perspectives on mobile genetic elements: a paradigm shift for managing the antibiotic resistance crisis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2022; 377 (1842): 20200462. doi: 10.1098/rstb.2020.0462

45. Hall J.P.J., Harrison E., Baltrus D.A. Introduction: the secret lives of microbial mobile genetic elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2022; 377 (1842): 20200460. doi: 10.1098/rstb.2020.0460.
46. Hastings P., Rosenberg S., Slack A. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 2004; 12(9): 401–4.
47. Hooper D.C. Plasmids and genes contributing to high-level quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 56 (1): 105987. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105987.
48. Ikeda H. Illegitimate recombination mediated by double-strand breaks and end-joining in *Escherichia coli* / Ikeda H., Shiraishi K., Ogata Y. // *Advan. Biophys.* – 2004. – Vol. 38. – P. 3–20.
49. Ito T, Okuma K, Ma XX, et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat.* 2003;6(1):41-52. doi: 10.1016/s1368-7646(03)00003-7
50. Majewski J. Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation / Majewski J., Zawadzki P., Plickerill P. [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 1016–1023.
51. Manohar P., Tamhankar A.J., Lundborg C.S., Nachimuthu R. Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* species. *Front Microbiol.* 2019; 10: 574. doi: 10.3389/fmicb.2019.00574
52. Mario Juhas, Jan Roelof van der Meer, Muriel Gaillard, Rosalind M. Harding, Derek W. Hood, Derrick W. Crook. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* **33**, 376-393
53. Marti E., Variatza E., Balcázar J.L. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 456–459. doi: 10.1111/1469-0691.12446

54. Meier P. Mechanisms of homology-facilitated illegitimate recombination for foreign DNA acquisition in transformable *Pseudomonas stutzeri* / Meier P., Wackernagel W. // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 48. – P. 1107–1118
55. Norman, L. H. Hansen, S. J. Sorensen. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **364**, 2275-2289;
56. Partridge S.R. Analysis of antibiotic resistance regions in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35 (5): 82055. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x.
57. Porter J. N. Cultural conditions for antibiotic-producing microorganisms // *Methods in enzymology*, 1975. Vol. 43. P. 3-23.
58. Schmieger H, Schicklmaier P. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *fEmS microbiol Lett.* 1999;170(1):251-256. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13381.x.45.
59. Siguier P., Gournayre E., Varani A., Ton-Hoang B., Chandler M. Everyman's guide to bacterial insertion sequences. *Microbiol Spectr.* 2015; 3: MDNA3-0030-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014.
60. Stalder T., Barraud O., Casellas M., Dagot C., Ploy M.C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012; 3: 119. doi: 10.3389/fmicb.2012.00119.
61. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *nat rev microbiol.* 2005;3(9):711-721. doi: 10.1038/nr-micro1234
62. Vulic M. Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and control of exchange to enterobacteria / Vulic M., Dionisio F., Tazddei F., Radman M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 9763–9769
63. Waldor M., tschäpe h., Mekalanos J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* o139. *J. Bacteriol.* 1996; 178(14): 4157–65.

64. Wang Y., Batra A., Schulenburg H., Dagan T. Gene sharing among plasmids and chromosomes reveals barriers for antibiotic resistance gene transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2022; 377 (1842): 20200467. doi: 10.1098/rstb.2020.0467
65. Wozniak r., Waldor M. integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8: 552–63

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Адылбаева Аделина Эдуардовна
Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна
Организация: Башкирский государственный медицинский университет
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 11685
Начало загрузки: 26.06.2023 09:05:52
Длительность загрузки: 00:00:23
Имя исходного файла: Адылбаева ВКР.doc
Название документа: Стабильность генома штаммов бактерий при регенерации после их долговременного хранения методом криоконсервации
Размер текста: 97 кБ
Тип документа: Выпускная квалификационная работа
Символов в тексте: 99434
Слов в тексте: 11535
Число предложений: 973

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 26.06.2023 09:06:16
Длительность проверки: 00:01:40
Корректировка от 26.06.2023 09:14:49
Комментарии: [Автосохраненная версия]
Поиск с учетом редактирования: да
Проверенные разделы: титульный лист с. 1, содержание с. 2-3, основная часть с. 4-56, библиография с. 57-63
Модули поиска: Переводные заимствования (RuEn), ИПС Адилет, Модуль поиска "БГМУ", Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования издательства Wiley, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика*, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



СОВПАДЕНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
19,33%	0%	0%	80,67%

Совпадения — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

Самоцитирование — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирование — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальный текст — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

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

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

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	11,05%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	0	1	
[02]	2,87%	2,31%	Как происходит и чем лимитируется ... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	4	6	
[03]	2,65%	0,87%	2007_2_12-24.pdf (1/2) http://ecolgenet.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	4	
[04]	2,49%	2,49%	МЕТОДЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ... http://elibrary.ru	раньше 2011	Перефразирования по eLIBRARY.RU	4	4	
[05]	2,24%	2,24%	Плазмиды http://biofile.ru	13 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[06]	2,2%	2,2%	Механизмы множественной устойчи... http://elibrary.ru	21 Янв 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	5	5	
[07]	2,14%	0%	№4 http://izvuz.pnzgu.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	3	
[08]	2,1%	0%	Мобильные генетические элементы ... https://antibiotics-chemotherapy.ru	09 Фев 2023	Интернет Плюс*	0	21	
[09]	1,89%	1,89%	Интергративные конъюгативные элем... http://elibrary.ru	11 Янв 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	3	3	
[10]	1,86%	0%	Lateral genetic transfer and the constru... https://doi.org	30 Сен 2011	Издательство Wiley	0	13	
[11]	1,68%	1,68%	Том 7 №1 (3/6) http://biorosinfo.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	2	2	

[12]	1,65%	0%	не указано https://doi.org	26 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	27	
[13]	1,6%	0,8%	«СИБИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ КАК ИНСТ... http://ibg.anrb.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	2	3	
[14]	1,46%	0,01%	Интегративные конъюгативные элем... http://elibrary.ru	11 Янв 2017	eLIBRARY.RU	1	8	
[15]	1,45%	0%	Мобильные генетические элементы ... https://biomolecula.ru	17 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	12	
[16]	1,45%	0%	Мобильные генетические элементы ... https://biomolecula.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	12	
[17]	1,45%	0%	Мобильные генетические элементы ... https://biomolecula.ru	17 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	12	
[18]	1,44%	0%	Механизмы множественной устойчи... https://yandex.ru	28 Дек 2018	Интернет Плюс*	0	22	
[19]	1,42%	0%	Как происходит и чем лимитируется ... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	1	10	
[20]	1,35%	0%	Conjugative and mobilizable genomic isl... https://doi.org	31 Июл 2014	Издательство Wiley	0	9	
[21]	1,27%	0%	Мобильные генетические элементы ... https://biomolecula.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	7	
[22]	1,27%	0%	Мобильные генетические элементы ... https://biomolecula.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	7	
[23]	1,17%	0%	2007_2_12-24.pdf http://ecolgenet.ru	21 Ноя 2016	Интернет Плюс*	0	9	
[24]	1,15%	0%	ХОЛЕРА и патогенные для человека в... https://docplayer.ru	15 Апр 2021	Интернет Плюс*	0	14	
[25]	1,15%	0,95%	Скачать http://krelib.com	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	5	5	
[26]	1,15%	0,11%	Мобильные генетические элементы ... https://biomolecula.ru	02 Сен 2017	Интернет Плюс*	2	12	
[27]	1,14%	0,7%	А. С. Кони́чев, Г. А. Севастьянова Мол... http://dlib.rsl.ru	29 Мар 2022	Сводная коллекция РГБ	5	7	
[28]	1,11%	0,49%	Волкова, Ольга Викторовна Организа... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	2	6	
[29]	1,1%	0%	Integrating conjugative elements of the ... https://doi.org	28 Фев 2013	Издательство Wiley	0	6	
[30]	1,08%	0%	Antimicrobial use in aquaculture re-exa... https://doi.org	31 Июл 2013	Издательство Wiley	0	8	
[31]	1,06%	0%	Механизмы множественной устойчи... https://journals.eco-vector.com	16 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	14	
[32]	1,06%	0%	Механизмы множественной устойчи... https://journals.eco-vector.com	27 Дек 2021	Интернет Плюс*	0	14	
[33]	1,06%	0%	Gene flow, mobile genetic elements and... https://doi.org	30 Сен 2011	Издательство Wiley	0	7	
[34]	1,02%	0%	Методы длительного хранения колле... https://cyberleninka.ru	30 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	11	
[35]	1,01%	0%	The extended regulatory networks of S... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	7	
[36]	0,97%	0%	Antimicrobial Resistance in the Food Ch... https://ncbi.nlm.nih.gov	23 Дек 2020	Интернет Плюс*	0	15	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,94%	0%	Как происходит и чем лимитируется ... https://cyberleninka.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,94%	0%	Как происходит и чем лимитируется ... https://cyberleninka.ru	17 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,92%	0,07%	МЕТОДЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ... http://elibrary.ru	раньше 2011	eLIBRARY.RU	1	6	
[40]	0,87%	0%	Замарин, Антон Александрович Дете... http://dlib.rsl.ru	22 Фев 2019	Сводная коллекция РГБ	0	5	
[41]	0,86%	0%	Targeting Plasmids to Limit Acquisition ... https://frontiersin.org	17 Мар 2021	СМИ России и СНГ	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,85%	0%	Dissemination of Antimicrobial Resistan... https://frontiersin.org	05 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,84%	0,27%	Лавина, Анна Михайловна Гены-регу... http://dlib.rsl.ru	23 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	2	4	
[44]	0,8%	0%	http://antiplague.ru/wp-content/uploa... http://antiplague.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,79%	0,79%	ГЕНЫ <i>SDR<i>; ПАСПРОСТ... http://elibrary.ru	31 Авг 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[46]	0,79%	0%	Методы длительного хранения колле... https://cyberleninka.ru	03 Дек 2020	Интернет Плюс*	0	8	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,73%	0%	Genomic islands: tools of bacterial horiz... https://doi.org	31 Мар 2009	Издательство Wiley	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,73%	0%	Antibiotic resistance shaping multi-level... https://frontiersin.org	15 Июл 2020	СМИ России и СНГ	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,72%	0%	209196 http://biblioclub.ru	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	3	

[50]	0,69%	0%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	0	19	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,68%	0%	https://naukaip.ru/wp-content/uploads/... https://naukaip.ru	01 Июн 2020	Интернет Плюс*	0	11	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,68%	0%	Genomic analysis of ICEVchBan8: An aty... https://doi.org	04 Июн 2012	Издательство Wiley	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,67%	0%	Conjugative and mobilizable genomic isl... https://doi.org	31 Июл 2014	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,66%	0,07%	Механизмы множественной устойчи... http://elibrary.ru	21 Янв 2018	eLIBRARY.RU	1	4	
[55]	0,66%	0%	Червякова, Надежда Сергеевна Опти... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	4	
[56]	0,61%	0%	Integrating conjugative elements of the ... https://doi.org	28 Фев 2013	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	3	
[57]	0,61%	0%	Generation and analysis of an ICE R391 ... https://doi.org	30 Мар 2021	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	3	
[58]	0,59%	0,44%	Мобильные генетические элементы ... https://elibrary.ru	14 Июл 2022	eLIBRARY.RU	3	4	
[59]	0,55%	0%	The disparate effects of bacteriophages ... https://ncbi.nlm.nih.gov	06 Апр 2020	Интернет Плюс*	0	12	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,53%	0%	Петрова, Майя Александровна диссер... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,52%	0%	Пневмококковые биопленки – тема н... https://cyberleninka.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,52%	0%	http://ecobiotech-journal.ru/2019/pdf/e... http://ecobiotech-journal.ru	22 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,48%	0,48%	Медицинская микробиология, вирус... http://elibrary.ru	раньше 2011	Перефразирования по eLIBRARY.RU	2	2	
[64]	0,48%	0,48%	ЭКСТРАКТЫ ИЗ СПИРУЛИНЫ В КАЧЕС... http://elibrary.ru	09 Окт 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	2	2	
[65]	0,47%	0%	Allelic variation in Salmonella: an under... https://frontiersin.org	09 Янв 2020	СМИ России и СНГ	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,47%	0%	http://www.gosduma.net/analytics/pub... http://gosduma.net	31 Окт 2020	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,45%	0%	Киселев, Сергей Сергеевич закономе... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,43%	0%	Дмитрюкова, Марина Юрьевна диссе... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	
[69]	0,41%	0%	Диссертация: "Горизонтальный пер... https://art-ukraina.kiev.ua	14 Мая 2021	Интернет Плюс*	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,39%	0%	Молекулярно-генетические механиз... http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,37%	0%	Использование лиофильных аппарат... https://journal.microbe.ru	06 Фев 2023	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,37%	0%	Моделирование биопленки у бактер... http://emil.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	
[73]	0,36%	0%	https://sprov.ru/wp-content/uploads/2... https://sprov.ru	03 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,35%	0%	https://biorosinfo.ru/upload/file/journa... https://biorosinfo.ru	23 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,34%	0%	Микробиология. 2017. Т. 86, №2 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,34%	0%	Genetic mechanisms of antimicrobial re... https://frontiersin.org	24 Июл 2020	СМИ России и СНГ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,33%	0%	Горяев, Артем Анатольевич Штаммы ... http://dlib.rsl.ru	14 Июн 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,33%	0%	Диссертация на тему «Штаммы Vibrio ... https://dissercat.com	14 Янв 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,33%	0%	Кожина ДС_ПотаевСА_ВКР_33.04.01_... https://dissercat.com	24 Окт 2022	Кольцо вузов	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[80]	0,32%	0%	Genomic islands: tools of bacterial horiz... https://doi.org	31 Мар 2009	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО коллекции издательства Wiley	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,31%	0%	Филиппова, Юлия Владимировна Про... http://dlib.rsl.ru	25 Окт 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,31%	0%	Frontiers CTX-M Enzymes: Origin and ... https://frontiersin.org	19 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,31%	0%	Выживаемость пробиотических бакт... http://propionix.ru	17 Мая 2021	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,3%	0%	https://www.gause-inst.ru/sites/default... https://gause-inst.ru	24 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,29%	0%	Глазунова, Ольга Андреевна "Промот... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,28%	0%	Марданова, Лариса Альбертовна дисс... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,28%	0%	https://www.enu.kz/downloads/iyun/6-... https://enu.kz	18 Мар 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,28%	0%	Bacillus subtilis MutS Modulates RecA-... https://frontiersin.org	06 Июл 2020	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,26%	0%	A Novel Family of Acinetobacter Mega-P... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0,26%	0%	Филонов, Андрей Евгеньевич Микро... http://dlib.rsl.ru	28 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,26%	0%	Genomics and the evolution of antibioti... https://doi.org	14 Апр 2021	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО коллекции издательства Wiley	0	1	
[92]	0,25%	0%	Secondary Bacterial Infections During P... https://frontiersin.org	17 Апр 2021	СМИ России и СНГ	0	1	
[93]	0,25%	0%	rsl01001170581.txt http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,25%	0%	Transposons: the agents of antibiotic re... https://doi.org	30 Ноя 2018	Издательство Wiley	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,23%	0%	Структура генома прокариот https://revolution.allbest.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,23%	0%	Структура генома прокариот https://revolution.allbest.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,22%	0%	ГЕНЫ <i>>SDR</i>; ПАСПРОСТ... http://elibrary.ru	31 Авг 2017	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,22%	0%	Frontiers Advantages and Limitations ... https://frontiersin.org	07 Июл 2021	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,22%	0%	Использование лиофильных аппарат... http://elibrary.ru	27 Дек 2016	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,21%	0%	Синёва, Ольга Николаевна Почвенны... http://dlib.rsl.ru	21 Сен 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,21%	0%	Characterization of a P1-Like Bacterioph... http://aac.asm.org	06 Янв 2018	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО Интернету (ЕН)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,19%	0%	COMPOSITION OF BACTERIAL STRAINS,... http://freepatentsonline.com	03 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0,19%	0%	Эстетическое восстановление депуль... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,19%	0%	Применение композитно-армирован... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0,19%	0%	Йодсодержащие тиреоидные гормон... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,19%	0%	Прошло заседания межведомственно... https://ufa.bezformata.com	21 Дек 2022	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	0,19%	0%	Менеджмент и Бизнес-Администриро... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[108]	0,19%	0%	Сравнительный анализ правового об... http://ivo.garant.ru	20 Ноя 2021	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0,19%	0%	Вопрос: Сроки и размер выплаты ден... http://ivo.garant.ru	25 Дек 2021	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	0,19%	0%	Коронавирус COVID-19 http://ivo.garant.ru	08 Фев 2020	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	0,19%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	05 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,19%	0%	Государственная фармакопея Россий... http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,18%	0%	Масс-спектрометрия для анализа объ... http://studentlibrary.ru	19 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,18%	0%	Масс-спектрометрия для анализа объ... http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,18%	0%	Масс-спектрометрия для анализа объ... http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,18%	0%	273789 http://biblioclub.ru	20 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	0,18%	0%	Т. 2 http://emll.ru	28 Апр 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	0,18%	0%	Прогнозирование преждевременных... http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0,17%	0%	PSM-Mec-A Virulence Determinant that ... https://frontiersin.org	12 Мар 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0,17%	0%	Культивирование бактерий . Курсова... http://bibliofond.ru	01 Янв 2017	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО ИНТЕРНЕТУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0,17%	0%	Is quorum sensing a side effect of diffusi... http://elibrary.ru	24 Авг 2002	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0,17%	0%	Боратырева, Мария Александровна К... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0,16%	0%	ГРАЖДАНСКОЕ ПРАВО. Т.3. ОСОБЕНН...	06 Мар 2017	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0,16%	0%	Транспозоны — Википедия https://ru.wikipedia.org	07 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[125]	0,16%	0%	Antimicrobial resistance of commensal ... http://elibrary.ru	26 Авг 2004	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0,16%	0%	Resistance integrons and super- integro... https://doi.org	30 Апр 2004	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[127]	0,16%	0%	Транспозоны http://ru.wikipedia.org	29 Янв 2017	ПЕРЕФРАЗИРОВАНИЯ ПО ИНТЕРНЕТУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[128]	0,15%	0%	Vector System for Site-Specific Integrati... http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	0,15%	0%	Т. 2 http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[130]	0,15%	0%	Фитохимический анализ 2018	01 Июн 2018	Модуль поиска "БГМУ"	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[131]	0,15%	0%	Frontiers Characterization of IncC Plas... https://frontiersin.org	26 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[132]	0,15%	0%	Современное состояние процедуры д... https://cyberleninka.ru	19 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[133]	0,14%	0%	Озерская, Светлана Михайловна фунд... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[134]	0,14%	0%	Красюк диссертация антиплагиат	30 Мая 2018	Модуль поиска "БГМУ"	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[135]	0,14%	0%	http://mbio.bas-net.by/wp-content/upl... http://mbio.bas-net.by	24 Дек 2021	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[136]	0,14%	0%	T. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	0,13%	0%	ФИПС - Федеральное государственное... http://www1.fips.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[138]	0,13%	0%	2007-2008 гг. http://www1.fips.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[139]	0,12%	0%	MicroReview: Divided genomes: negotia... https://doi.org	30 Июн 2005	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[140]	0,11%	0%	Молекулярная биология бактерий http://emll.ru	28 Апр 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[141]	0,11%	0%	Белова, Галина Ивановна Структурно... http://dlib.rsl.ru	14 Июн 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[142]	0,11%	0%	4. Методы хранения культур микроо... https://studfile.net	27 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[143]	0,11%	0%	Методы хранения культур микроорг... http://biochemi.ru	11 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[144]	0,11%	0%	Unsaturated fatty acids are inhibitors of... https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov	26 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[145]	0,1%	0%	Биоорганическая химия. 2017. Т. 43, ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[146]	0,1%	0%	http://mbio.bas-net.by/wp-content/upl... http://mbio.bas-net.by	18 Авг 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[147]	0,1%	0%	Молекулярная биология клетки. Т. 1 http://biblioclub.ru	20 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[148]	0,1%	0%	Semi-Conservative DNA Replication Le... https://nature.com	26 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[149]	0,09%	0%	Eukaryotic Cells with Artificial Endosym... http://freepatentsonline.com	04 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[150]	0,09%	0%	Солонин, Александр Сергеевич Гориз... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[151]	0,08%	0%	Конструирование систем экспрессии ... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[152]	0,08%	0%	Saccharomyces cerevisiae Induces Imm... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[153]	0,08%	0%	Исаев Артём Борисович; [Место защи... http://dlib.rsl.ru	08 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.