

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

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

На правах рукописи



Витковский Станислав Викторович

**Стабильность генома штаммов бактерий при
регенерации после их долговременного хранения
методом лиофилизации**

Научный руководитель:
д.б.н доктор
кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии



Ан. Х. Баймиев

Уфа – 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	2
Актуальность исследования.	2
Цель исследования.	3
Задачи исследования.	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
1.1 Организация генома прокариот	4
1.2 ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ.....	10
1.3 РЕКОМБИНАЦИЯ БАКТЕРИЙ.....	12
1.4 СПОСОБЫ ДОЛГОВРЕМЕННОГО ХРАНЕНИЯ БАКТЕРИЙ.....	17
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	20
2.1 Объект исследования.	20
2.2. Использованные реактивы.....	20
2.3 Оборудование	21
2.4 Приготовление жидких питательных сред для культур <i>E.Coli</i> и <i>R.Leguminosarum</i>	23
2.5. Приготовление плотных питательных сред для культур <i>E.Coli</i> и <i>R.Leguminosarum</i>	24
2.6 Посев на жидкую питательную среду	25
2.7 Посев на плотную питательную среду.....	26
2.8 Лиофилизация.....	27
2.9. Выделение бактериальной ДНК из бактерии	28
2.10. Проведение полимеразной цепной реакции	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	32
ВЫВОДЫ.....	39
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	40

Перечень условных обозначений (сокращений)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЖПС – плотная питательная среда

ППС – плотная питательная среда

LB - Lysogeny broth

УМ – Yeast Molds

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

E. coli – Escherichia coli

R. leguminosarum - Rhizobium leguminosarum

ГПГ – Горизонтальный перенос генов

ОГПГ - Отдаленный горизонтальный перенос генов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Лиофилизация является одним из основных способов продолжительного хранения биоматериала. Он используется во многих областях, начиная от пищевой индустрии и фармацевтики и заканчивая генетическими банками, создаваемыми для длительного хранения генетической информации. Хранения методом лиофилизации, позволяет сохранять образцы вплоть до 50 лет, при соблюдении всех необходимых условий.

Однако метод обладает достаточно крупными минусами. Лиофилизация для протекания необходима в наличие дорогостоящего тяжёлого оборудования, а также свои нюансы на этапе подготовки при организации протективных мер, для сохранения заготавливаемого субстрата.

Лиофилизация проводится в условиях пониженного давления и температуре ниже тройной точки воды, что обеспечивает сублимацию льда, позволяя ему перейти в парообразное состояние, минуя жидкую фазу. Подготовленную среду подвергают глубокой заморозке, затем вся жидкость удаляется из продукта, оставляя лишь осадок состоящий из высушенного исходного материала.

Бактерии, в процессе подвергаются огромному стрессу, испытывая колоссальную физическую нагрузку, подвергаясь воздействию опасных механических процессов. Данная нагрузка может приводить как к механическим повреждениям клетки в отсутствии криопротекторов, так и приводить в действие процессы, действие которых может привести к потере генетической информации, что может стать проблемой при последующем использовании данных культур.

В связи с этим является весьма актуальным выяснить степень изменения генетической информации внутри клетки после воздействия на неё методом лиофилизации и определения необходимости проведения контроля генетической информации после каждого оживления культуры

Исследования проводились в соответствии с методикой работы в лабораторных условиях с соблюдением стерильных условий и техники безопасности в рамках сохранения целостности эксперимента.

Цель исследования.

Выявить влияние способа лиофилизации 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* ГЛ9 путем трансформации их плазмидным вектором, несущим гены флуоресцентного белков.
2. С использованием маркированных штаммов *E.coli*, выявить стабильность мобильной части генома бактерий при обычном культивировании на питательных средах.
3. Провести сравнительный анализ влияния лиофилизации на потери маркерных фенотипических признаков, детерминированных на плазмиде лабораторных штаммов бактерий и диких вариантов микроорганизмов.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Организация генома прокариот

Прокариоты - это одноклеточные живые организмы, одним из главных отличий которых является отсутствие оформленного ядра в цитоплазме клетки. Размножаются данные организмы с помощью бинарного деления (Адхья и др., 2009) Адхья С., Альперт К.-А., Буккель В. и др. Современная микробиология. Прокариоты: В 2 т. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. Пер. с англ. М.: Мир, 2009. 1192 с

Геном же представляет из себя физическую и генетическую совокупность всех генов и генетических элементов, представленных в клетках. Его функцией является хранение и реализация биологической информации, используемой во всех процессах жизнедеятельности.

Геном прокариот по своему устройству подразделяется на две структуры – кольцевую молекулу ДНК, она же нуклеоид, по своей сути это аналог хромосомы, в которую входят структурные гены участвующие в кодировании белков и РНК, межгенные участки, различные мобильные элементы и элементы регуляции, осуществляющие определение работы генов. Вторая же структура представлена плазмидой.

Большую часть генома прокариот (как правило, около 80–90%) составляют последовательности ДНК, кодирующие белки и РНК. Интроны у бактерий встречаются как в генах, кодирующих рибосомные и транспортные РНК, так и в генах кодирующих белок.

Геном прокариот является динамичной структурой даже в пределах одного вида. Сведения полученные путем секвенирования генома одного конкретного штамма не позволяют говорить о геноме всего вида из-за штаммовых различий в составе генов и размерах геномов.

Так, например, у разных по патогенности штаммов кишечной палочки различия по количеству генов могут достигать 30 %. На основе этого сложилось представление о вариабельности генома клетки, а именно разделении его на базовую, то есть основную часть и на гибкую часть.

Консервативный базовый набор включает гены так называемого «домашнего хозяйства», ответственные за информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую/родовую принадлежность. В категорию вспомогательных генов входят операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие из таких генов локализованы в плазмидах, мобильных элементах, геномных островках, которые не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида.

Исследования структур геномов прокариот с использованием генетических и физических методов (электронная микроскопия, электрофорез в пульсирующем поле и другие), а позднее и посредством полногеномного

секвенирования показали, что большинство геномов прокариот представляют собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК. У некоторых бактерий обнаружены и линейные хромосомы, однако их структура отличается от той что присутствует у эукариотов, они имеют специальные концевые последовательности - теломеры, и используют при репликации теломеразу. В отличие от, эукариот, бактерии используют иные механизмы. У стрептомицетов, обладающих линейными хромосомами, к 5'- концам ковалентно присоединены белки, обеспечивающие свободный 3'-ОН конец для инициации репликации. Другой тип линейных хромосом, имеющих ковалентно замкнутые «шпилечные» концы, обнаружен у спирохет рода *Borrelia*. Некоторые бактерии помимо основной кольцевой хромосомы имеют и дополнительные. Так, две кольцевые хромосомы обнаружены у *Vibrio Cholerae*, а у фитопатогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* выявлены одна кольцевая и одна линейная хромосомы.

Помимо хромосомных генов, кодирующих белки и РНК, в состав геномов прокариот входят и другие генетические структуры, такие как: мобильные элементы, плазмиды, интегроны, профаги, CRISPR локусы и различные регуляторные элементы.

Мобильные элементы представляют собой фрагменты ДНК, способные к внутрихромосомным перемещениям или к передаче в другую клетку. К ним относятся: инсерционные элементы (IS-элементы), кодирующие ферменты, необходимые для их перемещения (транспозазы), транспозоны, а также миниатюрные инвертированные повторяющиеся элементы (MITE), которые не содержат генов транспозаз. Характерной структурной особенностью IS элементов является наличие на их концах коротких инвертированных повторов. Транспозоны представляют собой мультигенные структуры, как правило, фланкированные двумя идентичным IS элементами. При перемещении транспозона, возможно, как его «вырезание» и перенос в другой участок генома, так и дупликация, при которой исходная копия сохраняется.

Интеграция мобильных элементов может не только вызывать инактивацию гена при «попадании» внутрь гена, но также «включать» и «выключать» соседние гены, поскольку в транспозонах могут находиться и промоторы или терминаторы транскрипции. Одинаковые мобильные элементы в разных районах хромосомы являются гомологичными участками, рекомбинациями между которыми может приводить к геномным перестройкам. Число мобильных элементов в геномах варьирует в широких пределах. В некоторых геномах активные мобильные элементы вообще отсутствуют, а в других число их может исчисляться десятками. IS элементы одних и тех же семейств встречаются у архей и бактерий, что свидетельствует о возможности перемещения мобильных элементов между бактериями и археями, обитающими в одной экологической нише.

Наряду с генами, необходимыми для собственной транспозиции, транспозоны могут содержать и полезные для клетки гены, например, гены устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам. Часто такие гены локализованы на конъюгативных транспозонах, способных к переносу в другие клетки. В этих крупных транспозонах (до 100 т.п.н.) находятся гены, обеспечивающие образование конъюгативного мостика между бактериями и перенос ДНК в клетку-реципиент.

К числу мобильных элементов относятся также интегроны – генетические элементы, имеющие в своём составе интеграционный модуль с геном интегразы, сайтом интеграции и промотором, направленным в противоположную от гена интегразы сторону.

Благодаря этому модулю, интегроны способны встраиваться в геном и экспрессировать чужеродные гены в составе кассеты, которая может содержать десятки генов. Интегроны, захватывающие гены устойчивости к антибиотикам, являются одним из факторов распространения лекарственной устойчивости у бактерий.

Плазмиды – автономно реплицирующиеся, внехромосомные генетические элементы. Как правило, представленные кольцевыми молекулами ДНК, однако встречаются и линейные плазмиды, по структуре аналогичные линейным хромосомам. Плазмиды не являются обязательным генетическим материалом в клетке, их потеря не приводит к гибели клетки., однако многие крупные плазмиды содержат огромное количество генов, кодирующих важные для клетки функции, которые могут оказаться необходимыми в определённых экологических условиях. Поэтому терминологическое отличие таких «мегаплазмид» от хромосом является условным.

Приобретаемые с плазмидами новые признаки в ряде случаев определяют названия плазмид: например, F плазида (fertility factor), придающая клеткам *Escherichia coli* донорные свойства, или плазида R, определяющая резистентность клеток к антибиотикам. Способность к автономной репликации плазмид обеспечивается наличием сайта инициации репликации (*ori*) и набором генов, кодирующих необходимые белки. Плазмиды содержат лишь часть необходимых для собственной репликации ферментов, используя также компоненты репликационного аппарата клетки-хозяина. Специфичностью *ori*-сайта не могут сосуществовать в одной клетке. Многие плазмиды кодируют и собственные инициаторные белки, специфически распознающие *ori*-сайты. Это снижает зависимость плазмиды от клетки-хозяина и расширяет спектр возможных хозяев, что способствует межвидовому переносу генетического материала.

Плазмиды могут содержать несколько *ori*-сайтов, функционирующих в разных организмах-хозяевах или в одном штамме, но в разных условиях. Некоторые плазмиды могут интегрироваться в хромосому клетки-хозяина и реплицироваться в её составе в виде эписомы. Число копий плазмид в клетке может варьировать в широких пределах, от одной до нескольких сот копий на хромосому, но во всех случаях их количество регулируется, поскольку

неограниченная репликация плазмидной ДНК привела бы к гибели клетки.
[шестаков]

Экспрессия генов управляется с помощью регуляторных элементов генома, в которые входят промоторы, терминаторы транскрипции, аттенюаторы, сайты связывания регуляторных белков[1]. Экспрессируемый отдельно ген прокариот помимо кодирующей структуры белка или РНК содержит также промоторы и терминаторы транскрипции. Гены отвечающие за одни и те же функции часто располагаются подряд и транскрибируются в одной мРНК. Такой порядок генов называется опероном. Гены, сцепленные в составе оперона управляются координированно, объединение в оперон облегчает ГПГ целого кластера генов

Промотор – последовательности нуклеотидов в ДНК, узнаваемые РНК-полимеразой как стартовые площадки для начала специфической транскрипции. Промоторы несут на себе два участка, один из которых нужен для определения, а другой для связывания промотора с РНК-полимеразой. В основном у прокариот данные последовательности представлены TTGACA и ТАТААТ, расположенные на расстояниях 35 и 10 нуклеотидов от точки начала транскрипции. Области промоторов могут содержать сайты специфических нуклеотидных последовательностей, способных к взаимодействию с репрессорами или энхансерами транскрипции. Сайт связывания рибосом как правило располагается посреди точкой начала транскрипции и стартовым кодоном.

Для окончания процесса транскрипции задействуется участок ДНК под названием терминатор, передающий сигнал обрывающий процесс транскрипции в конце гена. Терминаторные гены в основном содержат инвертированные повторы длиной в пару нуклеотидов, образующие шпильку в РНК. Также в остановке транскрипции могут участвовать последовательности аттенюаторы, ослабляющие процесс транскрипции.

Воздействие низких температур вызывает несколько осложнений на клеточном уровне, в том числе ингибируя процесс трансляции на рибосомах, по причине образования у РНК и ДНК стабильных вторичных структур, к чему также добавляется снижение текучести мембраны и цитоплазмы. В ответ на что происходит индукция синтеза белков CspA, CspB, CspG и CspI, связывающих цепи ДНК и РНК, выполняющих роль активаторов транскрипции, а также шаперонов, препятствующих стабилизации вторичной структуры РНК, препятствующих трансляции вторичных структур РНК. Синтез других белков холодового шока обеспечивает активность рибосом даже при низких температурах, а сохранение оптимальной текучести мембраны достигается за счет увеличения содержания в ней ненасыщенных жирных кислот. Кроме того, увеличивается синтез ДНК-гиразы GyrA и гистон-подобного белка H-NS, поскольку CspA взаимодействует с так называемой Y-последовательностью в их промоторах и активирует их транскрипцию. ДНК-гираза увеличивает отрицательную суперскрученность ДНК, и такая форма ДНК временно превалирует в охлажденных клетках, а H-NS является глобальным транскрипционным регулятором, важным, в частности, для эффективной адаптации к низким температурам

https://www.researchgate.net/profile/Sergey-Cheresiz/publication/303822416_MOBILNYE_ELEMENTY_I_STRESS_MOBILNYE_ELEMENTS_STRESS/links/57563f9808aec74acf5839ea/MOBILNYE-ELEMENTY-I-STRESS-MOBILE-ELEMENTS-STRESS.pdf

1.2 ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ

Горизонтальный перенос генов – процесс, в котором организм передаёт генетический материал другому организму, не являющемуся его потомком. Исследования в области эволюционной геномики привели к пониманию того,

что процессы ГПГ играют важную роль в изменчивости, видообразовании и эволюции прокариот

В результате ГПГ возникла мозаичная структура генома и сформировались современные виды и штаммы бактерий, в понятие ГПГ, у прокариот, можно включать любые события переноса генов как внутри популяций одного вида, так и между организмами разных видов, родов и более крупных таксонов. Это означает получение генов от более чем одного родителя (клона), который размножается простым делением. Внутривидовой генетический обмен осуществляется, в основном, путем гомологичной рекомбинации, эффективность которой зависит от степени геномной гомологии, от наличия, активности и соотношения систем рекомбинации и репарации ДНК, контролирующих уровни спонтанного и индуцированного мутагенеза

Процессы гомологичной рекомбинации обеспечивают распространение «выгодных» аллелей в популяциях одного вида, но с разной скоростью у разных видов.

Однако, под термином ГПГ обычно принято понимать латеральный перенос генов от генетически отдаленных донорных организмов, неспособных к взаимодействию с реципиентом путем гомологичной рекомбинации. Такой ОГПГ обеспечивает приобретение новых генов, их модулей или генных блоков, увеличивающих адаптивный потенциал клетки и возможности освоения новых (изменившихся) экологических ниш. Ускорение процесса видообразования может быть обусловлено различными типами ОГПГ

1) включением гена, не имеющего аналога в геноме реципиента и придающего клетке радикально новые свойства;

2) приобретением паралогичного гена (с отдаленным филогенетическим родством), ответственным за проявление нового признака;

3) замещением резидентного гена другим ортологом, контролирующим сходную клеточную функцию.

Реализуется ОГПГ преимущественно системами сайт-специфической и незаконной рекомбинации при участии различных мобильных элементов, к числу которых относятся плазмиды, геномные островки, фаги, интегроны, инсерционные последовательности, транспозоны. (уже описывал их ранее)

Генетический перенос осуществляется системами:

1. Трансформации – поглощение экзогенной ДНК
2. Конъюгации – физический контакт донора с реципиентом
3. Трансдукции – при помощи вирусов

По этим каналам переносятся любые гены, но лишь небольшая их часть включается в геном реципиента для последующей экспрессии.

Реципиент принимает чужеродные гены лишь если с ними идёт полезный селективный признак, в противном же случае он изгоняется или не допускается.

Процесс генетической трансформации проходит без участия каких-либо переносчиков. Донорная ДНК представлена либо фрагментами хромосомы, либо плазмидами. 6,16,52

Другие пути ГПГ связаны с участием некоторых перевозчиков -, плазмид в процессах конъюгации и фагов при трансдукции. С помощью этих систем производится перемещение как самих мобильных элементов, так и сегментов хромосомной ДНК, встроенных в плазмидную или фаговую ДНК, которые затем интегрируются в хромосому реципиента в ходе рекомбинации.

С функциями и перемещением мобильных элементов связан высокий уровень пластичности геномов многих бактерий.

1.3 РЕКОМБИНАЦИЯ БАКТЕРИЙ

Рекомбинация – процесс, приводящий к перераспределению генетического материала. Образование новых порядков генов в результате инверсий, дупликаций и делеций генов при неравном кроссинговере и прочих процессах, связанных с разрывами и соединениями участков цепей ДНК.

На молекулярном уровне видно, что рекомбинации происходят в местах перекрестий и состоит в разрыве и воссоединении цепей в пределах существующих гомологичных областей ДНК рекомбинирующих хромосом

Не зная химической природы данного явления генетики использовали рекомбинацию в генетических исследованиях. При работе с *D. Melanogaster* и определении частот рекомбинаций проходящих между сцеплёнными парами аллелей они смогли сделать 3 важных вывода: гены располагаются в линейном порядке, члены аллельных пар обычно занимают одинаковое относительное положение на гомологичных хромосомах; рекомбинация происходит только внутри одной группы сцепления; частота с которой два разных сцепленных аллеля перекрещиваются зависит от расстояния между ними на хромосоме.

Исходя из этих принципов было установлено относительное положение различных генов на хромосомах многих организмов

Рекомбинация включает в себя несколько связанных воедино процессов, действие которых приводит к созданию новых комбинаций элементов носителей генетической информации. Рекомбинация между близко расположенными хромосомами приводит к интенсивной перетасовке генов отца и матери посредством мейоза, тем самым приводя в действие эволюционную проверку новых комбинаций этих генов в будущих поколениях. Рекомбинационные события как правило не приводят к изменению генотипа и фенотипа клетки, однако часто они становятся причиной перестройки последовательности ДНК, приводя к приобретению, потере или приумножению генетических элементов и постройке новых связей между уже существующими, но по другому локализованным элементам.

На молекулярном уровне можно определить, что рекомбинация генов представляет из себя образование ковалентных связей между нуклеотидными последовательностями различных областей в одной и той же или разных молекул ДНК.

Репликация по типу протекания подразделяется на три различные системы: Гомологичную, сайт-специфическую и незаконную. Различия отвечающие за эти процессы, определяют способность к горизонтальному переносу генов у разных штаммов/видов бактерий.

Гомологичная, или же общая рекомбинация, осуществляется во взаимодействии между собой протяжённых участков гомологичных последовательностей нуклеотидов. Такая рекомбинация часто называется гомологичной рекомбинацией, либо кроссинговером. При общей рекомбинации осуществляется разрыв двух гомологичных участков цепей ДНК, во время которого каждый из концов одного из сегментов затем соединяется с соответствующими концами другого таким образом, что образуются молекулы содержащие разные фрагменты участков принимающих участие в процессе. Сами фрагменты по размерам часто не совпадают.

Как правило гомологичная рекомбинация происходит между гомологичными и аллельными участками разных молекул ДНК, но она может произойти и между гомологичными, но неаллельными областями рекомбинирующих молекул. В этом случае один из продуктов рекомбинации утрачивает часть ДНК. А другой получает лишний фрагмент. Такое взаимодействие называется неравным кроссинговером. Порой рекомбинация протекает между неаллельными участками одной и той же хромосомы с соответствующей потерей области, лежащей между сайтами рекомбинации.

Однако некоторые процессы рекомбинации являются нереципрокными, что приводит к образованию двух продуктов, один из которых является

идентичному исходной молекуле, а второй отличается от обоих исходных молекул, такое взаимодействие называется геной конверсией.

Эффективность гомологичной рекомбинации определяется прежде всего степенью гомологии и протяженностью гомологичных участков ДНК, также должен присутствовать необходимый для инициации и протекания последующих этапов рекомбинации белок. Эти параметры отвечают за успех протекания рекомбинации с замещением изначального сегмента последовательности на фрагмент донорной ДНК. Работа гомологичной системы может приводить как к замещению фрагмента, так и включение новых последовательностей ДНК.

Чтобы могла произойти рекомбинация между двумя двойными спиралью, каждая из представленных четырёх цепей должна быть разорвана и соединена с другим фрагментом. Такой процесс назван миграцией ветвей. При этом происходит одновременное расхождение цепей изначальных спиралей и их соединение с новыми партнёрами, с образованием дуплексов.

Сайт-специфическая рекомбинация. Это рекомбинация в которой сайты разрыва и соединения происходит в тех участках генома, в которых имеются специфические участки, с которыми могут взаимодействовать определённые плазмиды и мобильные элементы. Когда в хромосому включается транспозируемый элемент появляются условия для рекомбинации с гомологичной последовательностью, попадающей в клетки через системы отдалённого горизонтального переноса генов.

С помощью сайт-специфической рекомбинации происходят плановые перестройки хромосомной ДНК, она также отвечает за разнообразие антител в организме. В отличие от общей рекомбинации для каждой перестройки сайт-специфической рекомбинации требуется узконаправленный набор ферментов для приведения механизма в действие.

Негомологичная или незаконная рекомбинация протекает с внедрением негомологичных последовательностей протекает в самых различных, случайных участках генома. Как пример такой процесс связан с образованием двунитевых разрывов и последующей стыковкой, образующей концы с фрагментами ДНК, содержащими гетерологичный ген. Происходит очень редко у прокариот, так как частое протекание данного процесса может привести к гибели клетки. К негомологичной рекомбинации также можно отнести процесс случайного встраивания плазмидной или вирусной генетической информации в ДНК клетки. В некоторых случаях негомологичная рекомбинация происходит между последовательностями, содержащими несколько гомологичных пар оснований, или между короткими частично гомологичными участками.

В общей рекомбинации участвуют два специфических фермента и еще несколько ферментов, катализирующих также процессы репликации и репарации ДНК. Энзимология общей рекомбинации изучена только для некоторых прокариотических организмов, в частности *E. coli* и ее фагов. Один из специфических ферментов, необходимых для успешной гомологичной рекомбинации, называется *recA* белком. [1книга]

Основная функция *RecA* белка в клетке это участие в процессе гомологичной рекомбинации и пострепликативной репарации. Он участвует в работе *RecBCD* и *RecF*-пути. В процессе рекомбинации *RecA* организует спаривание и обмен нитями между линейной и кольцевой ДНК. В одном сайте он связывает и удерживает цепь ДНК, во втором сайте связывания он держит цепь не имеющую своего *RecA* белка. Соударение происходит кратковременное из-за слабой связи и продолжается до тех пор, пока встреча гомологичных последовательностей не будет осуществлена.

RecA входит в систему SOS, важной функцией которой является репарация ДНК, выполняемая большой группой белков. В первую очередь, это мультиферментный комплекс из эндонуклеаз, кодируемых генами *uvrA*, *uvrB* и *uvrC* и получивший название «эксинуклеаза». Комплекс вырезает пиримидиновые димеры и другие обширные повреждения ДНК, возникшие при действии генотоксических агентов. Гены *UvrABC* репарации экспрессируются одними из первых при активации SOS-системы, для того чтобы успеть вырезать поврежденные участки ДНК до ее репликации

Данные о системе SOS свидетельствуют о том, что данная система также участвует и в обеспечении адаптации бактерий к воздействию различных стрессовых факторов. В частности, белки теплового шока GroES и GroEL индуцируются при повреждении ДНК, обеспечивая протекание SOS-мутагенеза [1]

<https://cyberleninka.ru/article/n/sos-sistema-reparatsii-dnk-u-bakteriy-obzor/viewer>

1.4 СПОСОБЫ ДОЛГОВРЕМЕННОГО ХРАНЕНИЯ БАКТЕРИЙ

Один из основных принципов поддержания бактерий в коллекционных центрах заключается в минимизации количества поколений штамма от момента его поступления в коллекцию до выдачи заявителю.

Для этого разработаны способы хранения бактерий в течение длительного времени без пересевов.

Хранение клеток без потери их биологических свойств на протяжении длительного времени, обеспечивается анабиозом. Это достигается двумя способами, непосредственно заморозкой при экстремальной температуре

(криоконсервация) либо их высушивание из замороженного (лиофилизация) или жидкого состояния (L-высушивание).

Лиофилизация является достаточно распространённым способом высушивания биоматериала из замороженного состояния, при котором свободная вода испаряется в условиях вакуума, позволяя первичной структуре объекта сохраниться во льду без его оттаивания. При хранении в правильных условиях, без попадания кислорода, света или влаги такой субстрат может храниться порой вплоть до 30 лет, сохраняя жизнеспособность засушенных бактерий[4]

Для данного процесса используются специальные сушильные шкафы, предназначенные для биомедицинских или фармацевтических препаратов, которые в свою очередь подразделяются на сублимационные аппараты коллекторного и камерного типа. В установках коллекторного типа ёмкость с биопрепаратом, будь то ампула, флакон или колба, отдельно связывают с индивидуальным трубопроводом для улавливания паров воды. В установках камерного типа сосуды находятся в единой камере сушильной установки, где осуществляется полный цикл высушивания препарата, после которого сосуды с сухим субстратом и плотно закрываются в изоляции от света, влаги и кислорода.

При подготовке биоматериала отбирают довольно немалое количество клеток, не менее 10^8 клеток/мл должно быть в одной суспензии. Их собирают в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазах роста для получения максимально стабильной и жизнеспособной культуры. Эти культуры суспендируют в среде со стабилизаторами, защищающими клетку от механических повреждений, выполнять роль стабилизатора могут: растворы желатина, пептона, сахарозы, глутамата натрия, сорбита и их различные смеси.

Лиофилизация в выполнении подразделяется на следующие этапы:

1. Заморозка биоматериала при температуре, при которой растворы защитных сред полностью переходят твёрдую фазу;
2. Первичное высушивание, вымороженная в лёд свободная жидкость сублимируется под воздействием подводимого тепла и вакуума;
3. Досушивание, во время которого связанная вода удаляется с более интенсивной подачей тепловой энергии

Из микроорганизмов лучше всех переносят сушку бактерии, которые в свою очередь разбиваются на три группы:

1. Очень стойкие, представители родов *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Salmonella* и т.д.. Выживание разнится в области 70-100%
2. Средние по стойкости, такие как *Brucella*, *Serratia*, *Pseudomonas*. Среди которых выживает до 70%
3. Чувствительные к высушиванию – бактерии из родов *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Spirochete*.

Хранятся засушенные культуры при температуре ниже 5°C. Чем температура ниже, тем больше будет и сохранность штаммов.

Для восстановления ёмкость с лиофилизованной культурой вскрывают, а затем добавляют стерильную жидкую среду. Суспензии дают раствориться, а затем переносят в 5 мл жидкой среды. После чего дозатором переносят 0,2 мл суспензии и наносят на чашку с ППС того же типа и состава откуда забор материала был совершён. Пробирки и чашки со средой инкубируют при оптимальной температуре, когда начинается их рост производят посев на свежеподготовленную среду, для того чтобы убедиться в отсутствии контаминации культуры.

<https://cyberleninka.ru/article/n/metody-dlitelnogo-hraneniya-kollektsionnyh-kultur-mikroorganizmov-i-tendentsii-razvitiya/viewer>

Пусть лиофилизация и позволяет сохранять бактерии в течение длительного времени в жизнеспособном состоянии, сам процесс консервации сопряжен с воздействием на клетку с множеством опасных физико-химических факторов, к которым относятся: Низкая температура, дегидратация, давление, изменение рН, что может вызывать повреждения и изменения клеточных компонентов, с чем, однако, частично помогают справиться криопротекторы.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1 Объект исследования.

Объектами исследования являются простейшие:

- *Escherichia coli* штамма XL-blue, имеющие генотип *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*
- Дикие штаммы *Rhizobium leguminosarum*

Их штаммы имеют встроенный в них ген, отвечающий за выработку пигмента зелёного или красного цветов при контакте с антибиотиком гентамицином.

2.2. Используемые реактивы

- Агар бактериологический;
- Триптон бактериологический;
- Натрий хлористый;
- Дрожжевой экстракт;
- Этиловый спирт;
- Хеликс;
- Бромистый этидий;
- Маннитол бактериологический;
- Растворы солей;
- Праймеры;
- Минеральное масло для ПЦР;
- Флуоресцентная краска;
- Гентамицин;
- Агароза для электрофореза;
- Желатин;
- Сахароза

2.3 Оборудование

- Термостат;
- ChemiDocMP Imaging System;
- Автоклав;
- Ламинарный бокс;
- Электронные весы;
- Лиофильная сушка FreeZone (Labconco, США);
- Дозаторы;
- Спиртовка;
- Микробиологические петли, стеклянные шпатели, стеклянные палочки, пинцеты, ножницы, скотч;

- Мерные цилиндры, стаканы, колбы;
- Чашки Петри;
- Термошейкер;
- Фотоаппарат;
- Центрифуга;
- Терцик ТП4-ПЦР-01;
- Электрофорез;
- Морозильник;
- ПЦР;
- Амплификатор;
- Вортекс.

Лиофилизатор - это агрегат, предназначенный для предварительного замораживания и последующей вакуумной сушки продуктов питания с целью их длительного хранения (пять и более лет) при полноценном сохранении всех полезных свойств. Изделие может выполнять сушку мяса, рыбы, кисломолочных продуктов, соков, ягод, фруктов и овощей. Кроме того, с помощью лиофилизатора могут производиться лекарственные порошкообразные вещества или биодобавки.

Сублиматор внешне представляет собой габаритную камеру в виде горизонтально установленного цилиндра, внутрь которого помещаются ряды стеллажей для обрабатываемого материала. Полки изготовлены из нержавеющей стали. Герметичность дверей обеспечивается надежными замковыми механизмами и плотной обтюрацией. Производится автоматический температурный контроль. Задействуется вакуумный насос, конденсатор, компрессор. Для работы главного двигателя требуется наличие источника питания в 380В.

2.4 Приготовление жидких питательных сред для культур *E.Coli* и *R.Leguminosarum*

Приготовление среды LB для *E.Coli*

1. Взвесить относительно посчитанного объёма дистиллированной воды:
 - Триптон – 1,5 %;
 - Дрожжевой экстракт – 1%;
 - NaCl – 1%.
2. Растворить в колбе дистиллированной водой
3. Стерилизовать в автоклаве при 121°C в течение 40 минут
4. После охлаждения колба извлекается и перемещается в ламинарный бокс для последующих манипуляций

Приготовление среды YM для *R. leguminosarum*:

1. Взвесить относительно посчитанного объёма дистиллированной воды:
 - Маннитол 1%;
 - Дрожжевой экстракт 0,04%.
2. Растворить в колбе с дистиллированной водой
3. Стерилизовать раствор в автоклаве при 121°C в течение 40 минут
4. После охлаждения колба извлекается и перемещается в ламинарный бокс.
5. В раствор добавляются дополнительные реагенты:
 - Р-р солей №1 – 0,5%:
 - KH_2PO_4 – 2%;
 - K_2HPO_4 – 5%;
 - FeCl – 0,5%;
 - Р-р солей №2 – 0,5%:
 - $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2%;
 - NaMoO_4 – 0,5%;

- CaCl₂ – 2%;

2.5. Приготовление плотных питательных сред для культур *E.Coli* и *R.Leguminosarum*

Приготовление среды LB для *E.Coli*

1. Взвесить относительно посчитанного объёма дистиллированной воды:
 - Триптон – 1,5 %;
 - Дрожжевой экстракт – 1%;
 - NaCl – 1%;
 - Агар-агар 2%;
2. Растворить в колбе с дистиллированной водой
3. Стерилизовать раствор в автоклаве при 121°C в течение 40 минут
4. После охлаждения колба извлекается и перемещается в ламинарный бокс.
5. В колбу добавляются дополнительные реагенты:
 - Гентамицин 0,1% (Добавляется в колбы с заготовкой ППС предназначенной для чашек с антибиотиком после стерилизации и до непосредственного залива)
6. Разлить среду по чашкам Петри
7. Дождаться застывания среды
8. Начать посев, либо убрать чашки со средой в холодильник

Приготовление среды YM для *R.leguminosarum*:

1. Взвесить относительно посчитанного объёма дистиллированной воды:
 - Маннитол 1%;
 - Дрожжевой экстракт 0,04%;
 - Агар-агар 2%;
2. Растворить в колбе с дистиллированной водой
3. Стерилизовать раствор в автоклаве при 121°C в течение 40 минут

4. После охлаждения колба извлекается и перемещается в ламинарный бокс.
5. В раствор добавляются дополнительные реагенты:
 - Р-р солей №1 – 0,5%:
 - KH_2PO_4 – 2%;
 - K_2HPO_4 – 5%;
 - FeCl – 0,5%;
 - Р-р солей №2 – 0,5%:
 - $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2%;
 - NaMoO_4 – 0,5%;
 - CaCl_2 – 2%.
 - Гентамицин 0,1% (Добавляется в колбу с заготовкой ППС для чашек с антибиотиком после стерилизации и до непосредственного залива)
6. Разлить среду по чашкам Петри
7. Дождаться застывания среды
8. Начать посев бактерий, либо убрать чашки со средой в холодильник для посева на другой день.

2.6 Посев на жидкую питательную среду

Колбы со средой после автоклавирования перемещаются в настольный автоклав. Крышка из фольги снимается. Колбы подписываются маркером в соответствии с маркировкой биологического материала для которого они предназначены.

Чашки с материалом извлекаются из холодильника, а затем переносятся в ламинарный бокс со стерильными условиями.

Крышка с чашки Петри снимается, проходит забор биоматериала с использованием бактериологической петли, а после, материал переносится в

жидкую среду соответствующего штамму типа. Затем колба вновь закрывается крышкой из фольги для предупреждения контаминации.

Данная процедура повторяется пока материал не будет распределён по всем колбам со средой, после чего на подносе они будут перенесены в термошейкер для инкубации на протяжении 3-4 суток при температуре в 37°C

2.7 Посев на плотную питательную среду

Жидкая питательная среда с биоматериалом из холодильника, вместе с чашками со средой соответствующего ей типа переносится в ламинарный бокс.

С использованием дозатора со стерильными наконечниками среда с биоматериалом переносится на центр плотной питательной среды, по которой распределяется круговыми движениями с использованием обработанного стеклянного шпателя.

Перед использованием стеклянный шпатель окунают в раствор этилового спирта, а затем поджигают на спиртовке и охлаждают. Данная процедура повторяется 5 раз перед каждой новой чашкой.

На каждый штамм приходится по 2 чашки. Одна с антибиотиком гентамицином и другая без.

По окончании работы засеянные чашки устанавливаются на несколько суток в термостат при температуре в 27°C, для инкубации биоматериала.

Спустя несколько дней чашки извлекаются, колонии подсчитываются, проводится фотосъёмка для запечатления результатов и получения фотографий для будущего сравнения. Чашки Петри отправляются в мойку.

Колонии с жидких сред были многократно пересеяны на чашки Петри с плотной питательной средой и затем поставлены в инкубатор для роста колоний, в половину чашек со средой был также предварительно добавлен

антибиотик гентамицин, при росте с которым культуры выделяли пигмент красного или зелёного цвета в зависимости от встроенного в них гена.

2.8 Лиофилизация.

Колонии с питательных сред вновь пересеиваются с помощью бактериальной петли на жидкую питательную среду и оставляются в термошейкере для инкубации. Параллельно с этим заготавливаются стерильные флаконы, резиновые крышки, фильтры, криопротекторы и вода.

С помощью дозатора в каждый флакон вносятся криопротекторы и жидкая среда с бактериями:

- Желатин 20% - 500 мкл;
- Сахароза 30% - 500 мкл;
- Жидкая среда с биоматериалом – 1000 мкл.

На каждый штамм приходится по 4 флакона, каждый из которых подписывается и нумеруется

С помощью скотча на флаконах был закреплён хлопчатобумажный фильтр, подготовленный субстрат отправляется в напольный лиофилизатор где был помещён в камеру на несколько часов. По прошествии процесса, получают флаконы с суспензией бежевого цвета. Поднос с флаконами извлекается и переносится в ламинарный бокс, где фильтры быстро заменяются на резиновые крышки для предотвращения попадания внутрь флаконов влаги. Закупоренные флаконы устанавливаются в сухой тёмный шкаф на 2 месяца.

Подписанные флаконы с культурами извлекались и оживлялись партиями, с использованием для этого стерильной воды. Суспензию внутри флаконов растворяли с использованием стерильной воды, а затем с использованием дозатора и шпателя материал наносился на плотные питательные среды с гентамицином и без. Засеянные чашки устанавливались

в термостат на несколько дней при температуре 27°C, для того чтобы дать культурам вырасти, по прошествии времени чашки извлекались. Проводился подсчёт выросших колоний со сравнительным анализом колоний что были получены до лиофилизации.

Ллиофилизацию проводили на лиофильной сушке FreeZone (Labconco, США) при температуре -50°C



Рисунок 1 – лиофильная сушилка FreeZone (Labconco, США).

2.9. Выделение бактериальной ДНК из бактерии

Полученные колонии пересеивались на новые чашки для получения чистых культур, а затем устанавливались в термостат при 27°C. По прошествии нескольких суток чашки извлекались.

На каждую чашку выделялось по одной маркированной пробирке для ПЦР установленной в планшет. С помощью бактериальной петли в каждую пробирку заносился биоматериал, затем в пробирки для выделения ДНК добавляли ионообменную смолу Chelex100.

Для изготовления Chelex100 в стерильной воде растворяются в соотношении с объёмом воды:

- Triton X-100 (1%) – 1%
- TRISHCL – 10%
- Chelex 100 – 1%

Также в смесь вносится красный крезоловый краситель. Смесь размешивается до полного растворения компонентов и взбалтывается перед работой. Реактив сразу применяется, а после работы хранится в холодильнике.

Пробирки с добавленным реактивом перемешивают на вортексе, а затем обжигают в термостате при 95°C на протяжении 10 минут, для денатурации и выделения ДНК, по окончании обжига перемешивание на вортексе повторяется.

Обожжённые пробирки затем раскручивают на центрифуге на протяжении 6 минут при 12000 оборотов/минуту. Полученную ДНК в пробирке после этого устанавливают в планшет в ожидании последующих манипуляций.

2.10. Проведение полимеразной цепной реакции

В отдельной стерильной пробирке заготавливается буферная реакционная смесь с праймерами:

На каждую пробирку отдельно рассчитывается данный объём компонентов смеси

- Праймер Gfor – 1 мкл
- Праймер Grev – 1 мкл
- DNTP – 2,5 мкл
- Таq буфер – 2,5 мкл
- Полимераза – 0,5 мкл
- Стерильная вода – 17,5 мкл

На каждую пробирку выходит 22 мкл смеси, к которым добавляются 3 мкл раствора с выделенной ДНК при помощи индивидуального стерильного наконечника для избегания контаминации. Смесь прокручивается на вортексе, затем в неё добавляется краска и после очередной раскрутки 1 капля минерального масла. Пробирки раскрутили на микро-центрифуге на протяжении 5 секунд при 3000 оборотов/минуту.

По окончании всех приготовлений пробирки переносят к прогретому амплификатору модели «Терцик МС-2». Амплификатор с пробирками запустили на 40 циклов

2.11. Определение результатов полимеразной цепной реакции

Определение продуктов реакции проводилось посредством использования электрофоретического метода, с использованием бромистого этидия и агарозного геля с применением УФ лампы.

Агарозный гель для электрофореза готовится следующим образом:

1. 980 мл дистиллированной воды разбавляют с 20 мл 50х-ного ТAE буфера, а затем тщательно перемешиваются.
2. 1,7 г агарозы перемешали с 2 мл 50х-ного ТAE буфера, а затем расплавили в микроволновой печи до появления в колбе смеси прозрачного цвета.
3. Агароза заливается в форму с двумя пластиковыми гребёнками на горизонтальной поверхности. Толщина геля не должна быть меньше 2 мм и не больше 5 мм. Гелю дают застыть и остынуть перед работой.

4. В камеру для электрофореза помещается застывший гель и заливается буфер пока он не покроет гель сверху на 2.10 мм.
5. С помощью дозатора, стерильными индивидуальными наконечниками пробы ДНК наносятся в сделанные гребешками лунки в геле, процедура повторяется вплоть до заполнения всех лунок.
6. Прибор включается в сеть. Клеммы подключаются так, чтобы анод стоял на старте и катод на финише.
7. Электрофорез запускается при следующих настройках:
 1. 400 мА
 2. 80 Вт
 3. 120 В
8. Процесс идёт на протяжении 20 минут, затем гель извлекается из формы и помещается на поднос, где окрашивается слабым раствором бромистого этидия на протяжении 7 минут.
9. Гель промывается под проточной водой а затем помещается в трансиллюминатор, излучающий УФ свет входящий в диапазон необходимый для флуоресценции ДНК в оранжево-красной области видимого спектра.
10. Затем через оборудование производится фотографирование, для последующего анализа результатов

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Один из основных принципов поддержания бактерий в коллекционных центрах заключается в минимизации количества генераций штамма от момента его поступления в коллекцию до его использования. Для этого разработаны способы хранения бактерий в течение длительного времени без пересевов. До недавнего времени, до появления метода криоконсервации, основным способом являлась лиофилизация бактериальных культур. Эта процедура заключается в замораживании микроорганизмов при очень низкой температуре, а затем удалении воды из замороженных клеток вакуумом. Этот

процесс позволяет сохранять микроорганизмы в течение долгого времени без необходимости хранения их в реактивных средствах. Известно, что многие известные бактериальные виды при этом сохраняют жизнеспособность после 50 лет хранения в высушенном состоянии. Высушивание позволяет получить бактериальный препарат в форме, удобной для транспортировки. Но при регенерации после лиофилизации обязательна процедура подтверждения их аутентичности для получения следующей генерации штамма. Огромное значение для сохранности живых бактерий при данном способе получения сухих препаратов зависит от индивидуально подобранных для каждой культуры условий лиофилизации, где важное место имеет криопротектант, добавляемый к культуре микроорганизмов перед сушкой.

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 лиофилизации. С целью выявить изменения геномов бактерий после долгосрочного хранения нами были получены флуоресцентно маркированные варианты 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.

Маркирование было осуществлено способом трансформации бактерий плазмидным вектором pJN105TurboGFP и pJN105TurboRFP, несущими гены флуоресцентных белков, а также гена антибиотикорезистентности к антибиотику гентамицину. Маркерные гены в составе плазмиды характеризуются тем, что один из маркеров, являющийся геном антибиотикоустойчивости можно селективировать за счет добавления

антибиотика в среду, второй маркер - ген флуоресцентного белка - не был подвержен селекции. Трансформацию бактерий плазмидой проводили путем электропорации. Селекцию проводили путем посева бактерий после трансформации на твердую питательную среду с антибиотиком. Для этого, перед началом работ по трансформации клетки были проверены на чувствительность к действию антибиотика гентамицина для возможности их селекции на данном антибиотике.

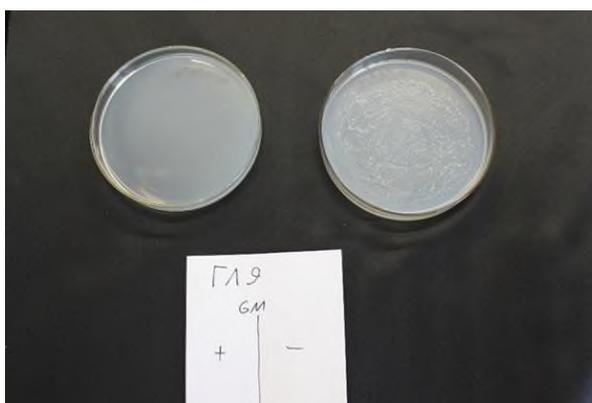


Рисунок 2 - Проверка штамма бактерий *Rhizobium leguminosarum* ГЛ9 на устойчивость к селектирующему антибиотику гентамицину. «+» - среда с антибиотиком; «-» - среда без антибиотика.

Далее полученные штаммы культивировали на жидкой питательной среде, а затем подготовили к лиофилизации. Лيوфилизацию проводили в присутствии 7,5% сахарозы и 5% желатина в качестве криопротекторов.



Рисунок 3, 4, 5 - Лиофилизированные культуры бактерий *Rhizobium leguminosarum*.

Далее бактерии регенерировали путем добавления во флаконы питательной жидкости, и получившуюся жидкую суспензию высевали на твердую агаризованную среду с содержанием и без содержания антибиотика.



Рисунок 6 - Лиофилизированные культуры бактерий *Rhizobium leguminosarum* после добавления питательной среды.

Было выявлено, что при регенерации значительная часть бактерий теряет свою плазмиду, что видно из того, что на среде без антибиотика вырастает большое количество колоний, но без окраса флуоресцентными белками, а на среде с антибиотиком количество колоний значительно было меньше и они были окрашены в зеленый цвет в следствии наработки ими зеленого флуоресцентного белка.

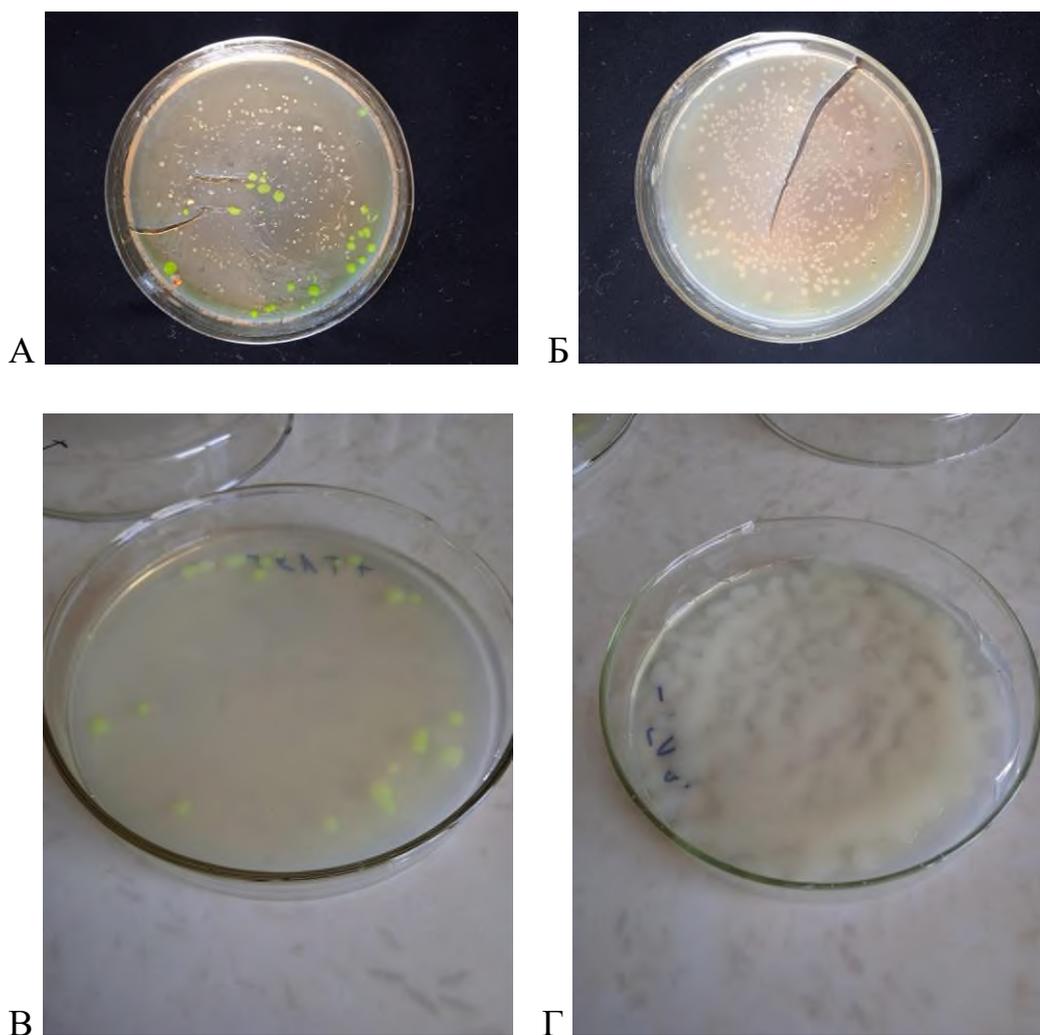


Рисунок 7,8,9,10 - Регенерация бактерий после лиофилизации. А и Б - *E.coli*; В и Г - *Rhizobium leguminosarum*; А и В – среда с антибиотиком; Б и Г – среда без антибиотика.

Причем это наблюдалось как в случае *E.coli*, так и *Rhizobium leguminosarum*. Элиминация плазмид является основной причиной изменения

фенотипа у микроорганизмов после длительного хранения бактерий в случае детерминации потерянного признака на генетических элементах.

Кроме того, нами обнаружена очень интересная деталь. При пересеве не окрашенных колоний, образовавшихся при регенерации бактерий после лиофилизации на чашки с селективирующим антибиотиком колонии опять принимают окраску.

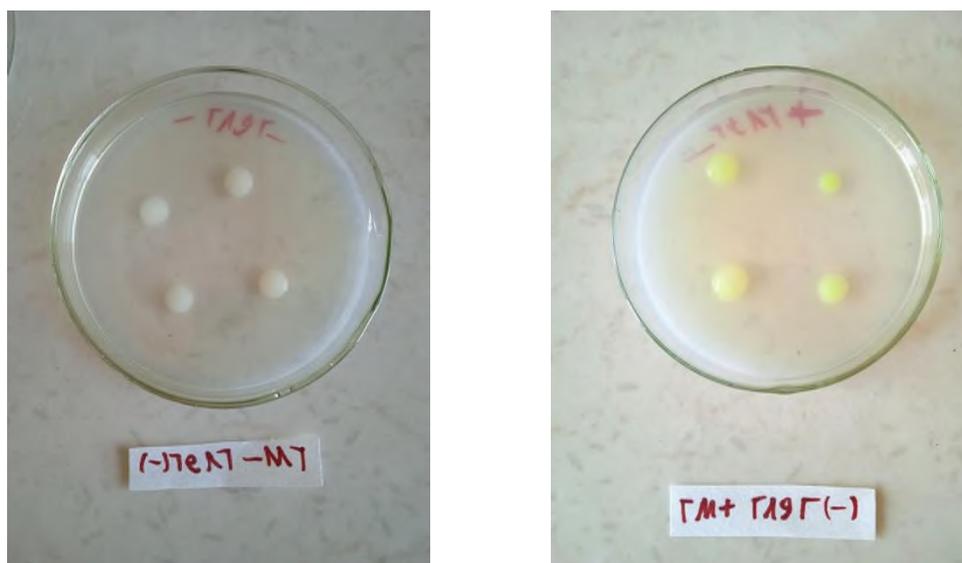


Рисунок 11, 12 - Колонии, пересаженные после регенерации с чашки без антибиотика. Для пересадки использовались колонии, не умеющие цветной окраски.

Это говорит о том, что не все белые колонии формируются бактериями, потерявшими плазмиду, потеря плазмиды в этих колониях скорее всего происходит во время ее формирования. Это дает возможность бактериям сохранять в колонии немногочисленные клетки, которые не потеряли этот генетический элемент и сохраняется возможность при появлении антибиотика в среде вновь воспользоваться генетической информацией, заложенной на плазмиде, что мы и видим на фотографии.

Это также подтверждается генетическим анализом разных колоний, не имеющих цветной окраски, выросших на среде без антибиотика. Несмотря на

то, что колонии не проявляют данный фенотип, в некоторых из них обнаруживается ген флуоресцентного белка.

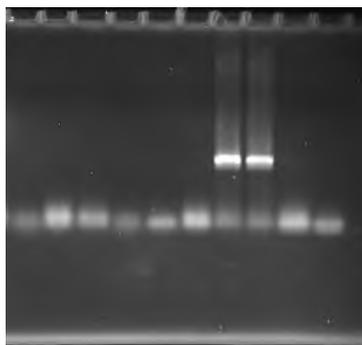


Рисунок 7 - Электрофореграмма ПЦР анализа колоний на наличие гена GFP.

Таким образом, несмотря на значительные преимущества метода лиофилизации при долгосрочном хранении микроорганизмов, необходимо иметь ввиду то, что бактерии высыхивание рассматривают как стресс и это часто может приводить к генетическим рекомбинациям и элиминации плазмид. Необходимо после регенерации бактерий при хранении методом лиофилизации проводить скрининг колоний, обладающих первоначальным фенотипом. Даже при первичной кажущейся потере, когда колонии не проявляют первоначального фенотипа, методом посева есть вероятность выявить неизменные варианты бактерий.

ВЫВОДЫ

1. Долговременное хранение бактерий способом лиофилизации и последующая регенерация их на питательной среде могут привести к изменению генотипа микроорганизмов за счет внутренней рекомбинации или элиминации плазмид микроорганизмов, что может привести к изменению их фенотипа
2. При элиминации плазмид в колонии бактерий это происходит не во всех клетках, и колония может восстановить свой исходный фенотип при появлении селектирующего фактора.
3. Применения для долговременного хранения бактерий способа лиофилизации является действенным методом при последующем скрининге бактерий с первоначальным фенотипом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адхья С., Альперт К.-А., Буккель В. и др. Современная микробиология. Прокариоты: В 2 т. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. Пер. с англ. М.: Мир, 2009. 1192 с.
2. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: учебник в 2-х томах. Мир, 1998. 391 с. ISBN 5-03-002850-
3. В. Ю. Ушаков SOS-СИСТЕМА РЕПАРАЦИИ ДНК У БАКТЕРИЙ УДК 579.26:579.222.4
4. ГЕНОМ ПРОКАРИОТ 2013 г. Н.В. Равин¹, С.В. Шестаков²
5. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/liofilizatsiya-shtamnov-patogennyh-mikroorganizmov-na-sublimateionnyh-ustanovkah-raznogo-tipa-i-otsenka-kachestva-poluchennyh>
6. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий <https://cyberleninka.ru/article/n/kak-proishodit-i-chem-limitiruetsya-gorizontalnyy-perenos-genov-u-bakteriy>
7. Б. Альбертс, А. Джонсон, Д. Льюис и др Молекулярная биология клетки: в 3-х тома. Институт компьютерных исследований, 2013. 808 с. ISBN 978-5-4344-0112-8.
8. Заварзин 2010)/шестаков Заварзин Г.А. Начальные этапы эволюции биосферы // Вестн. РАН. 2010. Т. 80. № 12. С. 1085–1098
9. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития <https://cyberleninka.ru/article/n/metody-dlitelnogo-hraneniya-kollektsionnyh-kultur-mikroorganizmov-i-tendentsii-razvitiya>
10. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля Современная микробиология М.: Мир, 2005. — Т. 1. — С. 437. — 654 с.

11. Сидякина, Т. М. Консервация микроорганизмов / Т. М. Сидякина. – Пушино : ОНТИ НЦБИ, 1985. – 63 с.
12. Бланков, Б. И. Применение лиофилизации в микробиологии / Б. И. Бланков, В. Л. Клебанов. – М. : Медгиз, 1961. – 282 с.
13. Morgan, C. A. Preservation of micro-organisms by drying: A review / C. A. Morgan, N. Herman, P. A. White, G. Vesey // *Journal of Microbiological Methods*. – 2006. – V. 66. – № 2. – P. 183–193.
14. Ильина Т. С. Суперинтегроны бактерий — источники новых генов с адаптивными функциями / Ильина Т. С. // *Генетика*. — 2006. — Т. 42, N 11. — С. 1536–1546.
15. Бородин П.М. Стресс и генетическая изменчивость // *Генетика*. 1987. Т. 23. С. 1003–1010.
16. Долинов К.Е. Основные технологии сухих биопрепаратов. М., 1996. – 219 с.
17. Филатова С.Н., Муравьева С.А., Фишман В.М. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Ascomyces parvullus*, основанное на методе ускоренного хранения. *Микробиология*. 1977; 46(2):318–23.
18. Матвеева Е.В. Сохранение генофонда фитопатогенных бактерий методом лиофилизации. *АГРО XXI*. 2007; 10–12:28–30.
19. Беккер М.Е., Рапопорт А.И., Калакуцкий Л.В. Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне; 1987. 240 с.
20. Льюин Б. Гены: Пер. 9-го англ. изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 896 с
21. Смирнов Г.Б. Механизмы приобретения и потери генетической информации бактериальными геномами // *Усп. соврем. биологии*. 2008. Т. 28. No 1. С. 52–76.
22. Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // *Экол. генетика*. 2007. Т. 5. No 2. С. 12–24.

- 23.Прозоров А. А. Горизонтальный перенос генов у бактерий: лабораторное моделирование, природные популяции, данные геномики / Прозоров А. А. // Микробиология. — 1999. — Т. 68, N 5. — С. 632–646.
- 24.Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. /Москва. Колос. 1971. 343 с.
25. Шестаков С. В. Геномика патогенных бактерий / Шестаков С. В. // Вестник РАМН. — 2001. — N 10. — С. 18–25.
26. Крылов В. М. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий / Крылов В. М. // Генетика. — 2003. — Т. 39, N 5.— С. 595–620.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Битковский Станислав Викторович
 Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна
 Организация: Башкирский государственный медицинский университет
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://www.bashgmu-antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 11669
 Начало загрузки: 23.06.2023 16:18:05
 Длительность загрузки: 00:00:11
 Имя исходного файла: Стабильность генома штаммов бактерий при регенерации после их длительного хранения методом лиофилизации (нынешний) docx
 Название документа: Стабильность генома штаммов бактерий при регенерации после их длительного хранения методом лиофилизации (нынешний)
 Размер текста: 42 кБ
 Символов в тексте: 42976
 Слов в тексте: 5085
 Число предложений: 407

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 23.06.2023 16:18:17
 Длительность проверки: 00:01:26
 Корректировка от: 23.06.2023 16:27:11
 Комментарии: [Автосохраненная версия]
 Поиск с учетом редактирования: да
 Проверенные разделы: титульный лист с. 1, содержание с. 2, основная часть с. 3-34, библиография с. 35-37
 Модули поиска: ИПС Адилет, Модуль поиска "БГМУ", Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс*. Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования издательства Wiley, 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

31,79%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

68,21%

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 «Самоцитирование» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирования — 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», «Самоцитирование», «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]	18,58%	14,81%	ГЕНОМ ПРОКАРИОТ. http://elibrary.ru	26 Дек 2013	Перефразирования по eLIBRARY.RU	3	5	
[02]	18,29%	3,13%	ГЕНОМ ПРОКАРИОТ http://elibrary.ru	26 Дек 2013	eLIBRARY.RU	2	13	
[03]	17,15%	0%	ГЕНОМ ПРОКАРИОТ https://vavilov.ifpb.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	48	
[04]	16,9%	0%	Н.В. Рэвин, С.В. Шестаков ГЕНОМ ПРО... http://bionet.nsc.ru	03 Сен 2017	Интернет Плюс*	0	48	
[05]	16,9%	0%	http://www.bionet.nsc.ru/vogis/downlo... http://bionet.nsc.ru	10 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	48	
[06]	16,9%	0%	http://www.bionet.nsc.ru/vogis/downlo... http://bionet.nsc.ru	04 Янв 2021	Интернет Плюс*	0	48	
[07]	16,9%	0%	http://www.bionet.nsc.ru/vogis/downlo... http://bionet.nsc.ru	04 Янв 2021	Интернет Плюс*	0	48	
[08]	16,84%	0%	http://propionix.ru/ravin_nv_shestak... http://propionix.ru	10 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	39	
[09]	16,84%	0%	https://propionix.ru/ravin_nv_shestak... https://propionix.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	39	
[10]	16,84%	0%	ГЕНОМ ПРОКАРИОТ http://bionet.nsc.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	47	
[11]	8,98%	5,82%	Как происходит и чем лимитируется ... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	2	10	

[12]	0,72%	0,72%	Как происходит и чем лимитируется ... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	8	
[13]	8,10%	0%	Как происходит и чем лимитируется ... https://cyberleninka.ru	09 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	30	
[14]	0,10%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	0	1	
[15]	7,86%	1,99%	2007_2_12_24.pdf (142) http://ecolgenet.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	2	5	
[16]	7,44%	0%	Как происходит и чем лимитируется ... https://cyberleninka.ru	17 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	19	
[17]	7,4%	0%	Как происходит и чем лимитируется ... https://cyberleninka.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	19	
[18]	5,72%	0%	Базилев, Андрей Ханифович диссерт... http://elibrary.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	3	
[19]	5,08%	0,57%	№ 3 (2016) https://journal.microbe.ru	17 Янв 2023	Интернет Плюс*	6	31	
[20]	3,50%	0,01%	Варшавомидзе, Ольга Эдуардовна Пн... http://elibrary.ru	30 Июл 2012	Сводная коллекция РГБ	1	5	
[21]	3,43%	0%	https://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle... http://elib.sfu-kras.ru	05 Янв 2023	Интернет Плюс*	0	11	
[22]	1,9%	0%	http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle... http://elib.sfu-kras.ru	05 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	9	
[23]	1,29%	0%	http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle... http://elib.sfu-kras.ru	15 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	9	
[24]	2,05%	0%	Генетика бактерий. Организация ген... https://myslide.ru	10 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	14	
[25]	2,9%	0%	https://core.ac.uk/download/pdf/84935... https://core.ac.uk	04 Янв 2021	Интернет Плюс*	0	11	
[26]	2,78%	0%	ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ Организация ге... https://present5.com	08 Сен 2022	Интернет Плюс*	0	12	
[27]	2,23%	1,78%	Механизмы повреждений бактерий п... http://elibrary.ru	раньше 2011	eLIBRARY.RU	3	6	
[28]	2,38%	0%	Механизмы повреждений бактерий п... https://cyberleninka.ru	14 Дек 2021	Интернет Плюс*	0	10	
[29]	2,58%	0%	Механизмы повреждений бактерий п... https://cyberleninka.ru	09 Ноя 2022	Интернет Плюс*	0	10	
[30]	2,42%	0,95%	Механизмы повреждений бактерий п... http://elibrary.ru	раньше 2011	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	4	
[31]	2,34%	0%	ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ http://study.net	10 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	7	
[32]	2,1%	0%	Инновационные процессы и техноло... http://elibrary.ru	01 Янв 2016	eLIBRARY.RU	0	4	
[33]	1,84%	0%	http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle... http://elib.sfu-kras.ru	29 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	5	
[34]	1,84%	0%	http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle... http://elib.sfu-kras.ru	17 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	5	
[35]	1,68%	0,25%	http://www.bio.msu.ru/res/Dissertation... http://bio.msu.ru	16 Янв 2021	Интернет Плюс*	4	10	
[36]	1,67%	0%	Лиофилизация штаммов патогенных ... http://cyberleninka.ru	06 Дек 2022	Интернет Плюс*	0	5	
[37]	1,64%	0%	«СИМБИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ КАК ИНСТ... http://od.angb.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	2	
[38]	1,6%	0,34%	Мазилон, Святослав Игоревич диссер... http://elibrary.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	1	4	
[39]	1,56%	0%	209196 http://elibrary.ru	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	5	
[40]	1,48%	0%	Иванова, Екатерина Сергеевна СибБ... http://elibrary.ru	22 Авг 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	
[41]	1,43%	0%	РОЛЬ ГЕНОМИКИ В ИССЛЕДОВАНИИ... http://elibrary.ru	25 Янв 2012	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	2	
[42]	1,42%	1,42%	№4 http://nizvz.rnspu.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	3	3	
[43]	1,4%	0%	Марданов, Андрей Владимирович Рас... http://elibrary.ru	15 Мар 2014	Сводная коллекция РГБ	0	3	
[44]	1,28%	0%	РОЛЬ ГЕНОМИКИ В ИССЛЕДОВАНИИ ... http://elibrary.ru	25 Янв 2012	eLIBRARY.RU	0	3	
[45]	1,2%	0%	Методы длительного хранения колле... https://cyberleninka.ru	30 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	4	
[46]	1,19%	0%	Методы длительного хранения колле... https://cyberleninka.ru	03 Дек 2020	Интернет Плюс*	0	5	
[47]	1,01%	0%	Червякова, Надежда Сергеевна Опти... http://elibrary.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	3	
[48]	0,95%	0%	Лиофилизация штаммов патогенных ... http://elibrary.ru	29 Апр 2017	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,91%	0%	МЕТОДЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ http://elibrary.ru	раньше 2011	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	2	
[50]	0,81%	0%	Ненцова, Ольга Викторовна диссерт... http://elibrary.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,8%	0%	Федоренко, Виктория Николаевна Вы... http://elibrary.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,8%	0%	Построение физических карт хромос... http://studopedia.net	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[53]	0,78%	0%	РЕКОМБИНАЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ. http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,78%	0%	РЕКОМБИНАЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ П.М. ... http://biomet.nsc.ru	23 Июнь 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,76%	0%	https://naukaip.ru/wp-content/uploads... https://naukaip.ru	01 Июнь 2020	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,75%	0%	https://www.bio.msu.ru/res/Dissertatio... https://bio.msu.ru	08 Apr 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,71%	0%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,61%	0%	https://krmu.edu.kz/wp-content/uploa... https://krmu.edu.kz	21 Окт 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,6%	0%	Дезоксирибонуклеиновая кислота — ... https://ru.m.wikipedia.org	06 Июнь 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,56%	0%	Сохранность культур бактерий разли... https://cyberleninka.ru	01 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,52%	0%	Толковый словарь по молекулярной ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,48%	0%	Targeting of RNA Polymerase II by a nuc... https://doi.org	30 Сен 2018	Издательство Wiley	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,48%	0%	Биоорганическая химия 2017. Т. 43, ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,48%	0%	Кошкарова, Лилия Андреевна Разраб... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,48%	0%	Микробиология. 2017. Т. 86, № 2 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,46%	0%	Диссертация на тему «Математическ... https://dissercat.com	09 Янв 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,45%	0%	http://vmlif.ru/docs/%D0%A6%D0%9A%... http://vmlif.ru	19 Авг 2019	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,45%	0%	Теории биологической эволюции с п... http://socialcompas.com	16 Июнь 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,44%	0%	КОНЬЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС ПЛАЗМ... http://elibrary.ru	30 Авг 2003	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,43%	0%	«СИМБИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ КАК ИНСТ... http://ibg.amib.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,4%	0%	Борщева, Юлия Александровна Биоте... http://dlib.rsl.ru	19 Авг 2020	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,4%	0%	1.2 http://emil.ru	08 Июль 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,4%	0%	Получение и исследование новых по... http://emil.ru	20 Янв 2020	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,4%	0%	https://rsmu.ru/fileadmin/templates/D... https://rsmu.ru	23 Июнь 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,38%	0%	Конструирование систем экспрессии ... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,38%	0%	Конструирование систем экспрессии ... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,38%	0%	174238 http://e-libbook.com	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,37%	0%	РОЛЬ БАКТЕРИОФАГОВ В ГОРИЗОНТ... http://elibrary.ru	29 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,37%	0%	1.3 http://emil.ru	08 Июль 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,37%	0%	Объяснена превращение безобидны... http://online.ru	16 Дек 2016	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[81]	0,37%	0%	Adherence and internalization of Strept...	31 Янв 2007	Издательство Wiley	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,37%	0%	Development of a new platform for secr...	31 Янв 2016	Издательство Wiley	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,37%	0%	Molecular genetics of 6-phosphofructo...	31 Авг 2002	Издательство Wiley	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,37%	0%	Исаев Артем Борисович; [Место защи...	08 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,37%	0%	Saccharomyces cerevisiae Induces Imm...	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,36%	0%	Александр Александр Юрьевич Разраб...	20 Янв 2010	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,36%	0%	Приказ Министерства образования и ...	24 Дек 2018	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,35%	0%	Приказ Министерства здравоохранен...	02 Июл 2011	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,35%	0%	Показатели эндотелиальной функции...	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0,34%	0%	Почвенная антибиотическая резисто...	17 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,31%	0%	Эукариотический горизонтальный п...	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,31%	0%	не указано	13 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,3%	0%	Санкт-Петербургский государственн...	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,27%	0%	Коронавирус COVID-19	08 Фев 2020	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,27%	0%	Государственная фармакопея Россий...	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,26%	0%	Лашин, Сергей Александрович диссе...	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,26%	0%	ВИДОВАЯ СПЕЦИФИКА МЕЖ- И ВНУТ...	15 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,26%	0%	не указано	13 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,25%	0%	Цитогенетика эволюционного проце...	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,25%	0%	Method for preserving microbial cells - ...	03 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,25%	0%	Method of culturing freeze-dried micro...	07 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,25%	0%	Method of culturing freeze-dried micro...	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0,25%	0%	Method of preserving lyophilized micro...	03 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,22%	0%	Genome and stress-reaction in animals ...	03 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0,22%	0%	Дипломная работа (ХЛЫСТИК) оконч...	24 Мая 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,22%	0%	Лиофилизация - эффективная методи...	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	0,22%	0%	Лиофилизация что это такое? Лиофил...	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[108]	0,21%	0%	Технология микроволнового обезво...	23 Июл 2021	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[109]	0,2%	0%	Технология получения композицион... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	0,2%	0%	http://www.science.vsu.ru/dissertations - http://science.vsu.ru	23 Июнь 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	0,19%	0%	Комплексная система оценки износо... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,18%	0%	Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 7... http://ivo.garant.ru	07 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,18%	0%	Острые цереброваскулярные наруше... http://diss.natlib.uz	29 Сен 2020	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,17%	0%	Оценка перспектив развития медици... http://ivo.garant.ru	19 Мар 2016	СПС ГАРАНТ; аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,17%	0%	Постановление Губернатора Пензенс... http://ivo.garant.ru	15 Дек 2021	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,17%	0%	Микробиологические обоснование в... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	0,17%	0%	Совершенствование этиопатогенети... http://diss.natlib.uz	07 Окт 2021	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.