

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Институт развития образования
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Горобец Ксения Сергеевна

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ МАТЕРИАЛОВ НА
АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* XL-BLUE

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор кафедры

фундаментальной

и прикладной микробиологии



Ан.Х.Баймиев

Уфа - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Актуальность	6
1.2 Бактерии <i>E.coli</i>	8
1.3 Строение клетки и клеточной стенки у <i>E.coli</i>	11
1.4 Формирование биопленок бактериями <i>E.coli</i>	13
1.5 Влияние структуры поверхности для возможности прикрепления бактерий <i>E.coli</i>	15
1.6 Проблема зарастания материалов используемых в медицинской практике	16
1.7 Различные способы маркировки бактерий	19
1.8 Микроскопирование в микробиологии	25
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Методика проведения на образце титана	34
2.2. Методики проведения на образце силикона	37
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	49

Список сокращений и условных обозначений

ЛПС – липополисахаридный слой

МПА – мясопептонный агар

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп

ТЭМ – трансмиссионный электронный микроскоп

AFM – Атомно-силовой микроскоп

ELID – метод электролитической обработки поверхности

FP – флуоресцентного белка

PALM/STORM – Photoactivated Localization Microscopy/Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

SIM-микроскопия – Structured Illumination Microscopy

SR – Сверхразрешающие микроскопы

STED – Stimulated Emission Depletion

TiBP – Триизобутилфосфат

Turbo RFP – Red Fluorescens Protein

ВВЕДЕНИЕ

В рамках данной работы проводится исследование влияния модификации поверхности различных материалов на адгезию бактерий *E. coli* XL-blue. Для проведения эксперимента будут использованы образцы титановых и силиконовых пластинок с различными модификациями поверхности. Полученные результаты позволят глубже понять механизмы адгезии бактерий к материалам и разработать новые эффективные методы борьбы с бактериальной контаминацией. Данные исследования могут быть применены для оптимизации качества медицинских имплантатов и оборудования, снижая риск инфекционных осложнений.

Титан — это биосовместимый металл, который отличается высокой устойчивостью к аллергическим реакциям у большинства людей. Благодаря этому свойству он активно используется в медицинской сфере для создания различных имплантатов и протезов, таких как зубные коронки, фиксаторы (винты) и искусственные суставы.

Силикон — это универсальный материал, который нашел широкое применение в медицине. Его популярность обусловлена простотой обработки, доступной ценой и разнообразием свойств. Силиконовые поверхности широко используются в медицинских учреждениях, в том числе для производства медицинских инструментов, оборудования и упаковочных материалов.

Титан, подобно другим материалам, подвержен бактериальной контаминации. Бактерии могут образовывать биопленку на его поверхности, что повышает риск инфекций и других неблагоприятных последствий. Силиконовые поверхности, в частности, демонстрируют высокую адгезию бактерий, что способствует распространению инфекций и негативно влияет на здоровье.

E. coli является стандартным модельным организмом для изучения бактериальной адгезии. Ее адгезия на поверхности материала может

служить показателем для анализа и контроля бактериальной адгезии в целом.

Данная дипломная работа посвящена исследованию влияния модифицированных поверхностей образцов титана на адгезию бактерий *E.coli*.

Цель дипломной работы. Провести анализ влияния модификации поверхности титана и силикона на степень адгезии лабораторных штаммов грамотрицательных бактерий *E.coli* XL-blue.

Объект исследования. Бактерии рода *Escherichia*, вида *Escherichia coli*.

Предмет исследования. Изучение воздействия модифицированной поверхности титана и силикона на способность к адгезии бактерий *Escherichia*, вида *Escherichia coli*.

Задачи:

1. Нарботать культуры штаммов *E.coli* XL-blue, маркированных зеленым и красным флуоресцентными белками.
2. Провести обработку бактериями образцов титановых и силиконовых пластинок с модифицированной поверхностью и без.
3. Провести микроскопический анализ степени адгезии бактерий на поверхности исследуемых образцов.

Практическое значение работы. Применение материалов с антибактериальными свойствами обеспечивает создание медицинских изделий, инструментов, протезов, имплантов и других продуктов, устойчивых к размножению бактерий. Такой подход повышает безопасность использования этих изделий в медицинской практике.

Область применения. Медицина, микробиологическая биотехнология.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность

Титан – материал, активно применяемый в медицине для создания имплантов и медицинских инструментов. Модифицируя его поверхностную структуру, можно существенно улучшить антимикробные свойства, снизить адгезию бактерий и, как следствие, сократить риск послеоперационных инфекций. Помимо этого, изменения поверхности повышают долговечность имплантатов.

Металлические импланты, подверженные износу в местах контакта, могут вызывать аллергические реакции и бактериальную контаминацию, а также отторжение организмом. Исследования, направленные на модификацию поверхности титана, направлены на минимизацию этих рисков, повышая безопасность и эффективность имплантации.

Исследования показали возможность снижения риска неблагоприятных последствий, связанных с титановыми имплантатами. Метод электролитической обработки поверхности (ELID) позволил уменьшить износ титанового импланта и повысить его биосовместимость [22].

В научных работах изучается адгезия бактерий к поверхности титана, а также влияние материала на рост микроорганизмов [3].

Некоторые исследования продемонстрировали, что обработка титановых пластин привела к значительному снижению количества бактерий на поверхности. Отличия в бактериальной колонизации были статистически значимыми [16].

Силикон, подобно титану, находит широкое применение в медицине благодаря своим исключительным свойствам: стерильности, прочности, гибкости и прозрачности. Однако важно понимать, как изменения на его поверхности могут влиять на взаимодействие с бактериями.

Исследования показали, что модификация поверхности силикона оказывает значительное влияние на адгезию бактерий. Например, применение антибактериальных покрытий или изменение химической структуры поверхности силикона может снизить уровень бактериальной адгезии [15].

В отличие от титана, некоторые материалы, например силикон, демонстрируют недостаточную биосовместимость, что приводит к образованию биопленок и, как следствие, к риску развития инфекционных осложнений.

На поверхности материалов, не обладающих достаточной биосовместимостью, могут образовываться биопленки. Этот процесс обусловлен несколькими факторами, включая:

Нарушение норм асептики: Несоблюдение правил стерильности создает благоприятные условия для роста и размножения микроорганизмов.

Благоприятная среда: Некоторые материалы могут обладать свойствами, способствующими росту и размножению микроорганизмов.

Адгезия бактерий: Бактерии, особенно патогенные, могут прикрепляться к поверхности материалов с помощью специфических белков, называемых адгезинами. Эти белки играют ключевую роль в формировании биопленки.

Образование биопленки: Образование биопленки является защитным механизмом для бактерий. Она препятствует действию антибактериальных веществ и способствует выживанию бактерий в неблагоприятных условиях.

Примером может служить образование биопленки на поверхности катетеров. Бактерии, например, *E.coli*, могут прикрепляться к катетеру с помощью адгезинов и вызывать сепсис.

Понимание механизмов адгезии бактерий к поверхности материалов имеет ключевое значение для разработки методов предотвращения

инфекций и улучшения долговечности медицинских имплантов, оборудования и других изделий.

Бактерия *E.coli* является одним из наиболее распространенных патогенов, вызывающих инфекции. Ее изучение позволяет понять механизмы адгезии и разработать стратегии для предотвращения инфекций, вызываемых другими видами бактерий.

Дальнейшие исследования в этой области направлены на создание новых материалов с улучшенными антибактериальными свойствами. Такие материалы позволят создавать более безопасные изделия из силикона и других материалов, минимизируя риск образования биопленки и инфекционных осложнений.

1.2 Бактерии *E.coli*

Бактерии рода Эшерихия принадлежат к классу *Gamma*proteobacteria, порядку *Enterobacterales*, семейству *Enterobacteriaceae* и роду *Escherichia*. Одним из основных видов этого рода, обладающим медицинским значением, является *Escherichia coli* (кишечная палочка) [5].

Эшерихии – это бактерии, которые имеют форму полиморфных палочек с закругленными концами, размерами 2-6 мкм в длину и 0,4-0,6 мкм в ширину. Они обычно располагаются одиночно или попарно, без образования спор. Клетки *E.coli* обладают пиллями (фимбриями) и могут двигаться благодаря перитрихально расположенным жгутикам. При окрашивании по методу Грама они становятся розового цвета и поэтому относятся к грамотрицательным бактериям. Под микроскопом они размещаются беспорядочно. Некоторые штаммы эшерихии образуют микрокапсулу [5].

Эшерихии способны расти как в присутствии кислорода, так и без него, что делает их аэробами или же факультативными анаэробами. Их оптимальная температура для размножения составляет 35–37 °С. Они

хорошо развиваются на простых питательных средах, быстро адаптируясь к различным условиям окружающей среды. На мясопептонном агаре (МПА) эшерихии образуют средние колонии серо-белого цвета с гладкой, блестящей поверхностью и ровными краями, S формы [1]. В исследовании было обнаружено, что эти бактерии адаптированы к быстрому размножению и сохранению жизнеспособности при разнообразных условиях.

Микроорганизмы из семейства эшерихии обладают значительной степенью устойчивости в своей среде. Они погибают при кипячении или облучении ультрафиолетовым излучением. Несмотря на свою адаптивность, эшерихии подвержены воздействию определенных факторов, которые могут привести к их гибели. Например, при температуре 60 °С они погибают за 15 минут, при 100 °С - мгновенно. В то же время, в воде или почве они могут сохранять жизнеспособность в течение месяцев. Прямой солнечный свет также оказывает смертельное воздействие на эшерихии всего за несколько минут. Эти микроорганизмы чувствительны к различным дезинфицирующим веществам и антибиотикам, однако они способны быстро развивать устойчивость к этим препаратам, в частности за счет наличия R-плазмид [2].

Эшерихии обычно обитают в дистальном отделе кишечника человека, животных, птиц, пресмыкающихся, рыб. Они являются санитарнопоказательными микроорганизмами, присутствие которых в воде, почве, на пищевых продуктах свидетельствует о фекальном загрязнении окружающей среды. Некоторые штаммы кишечной палочки могут вызывать инфекции и заболевания, хотя большинство безвредны и даже полезны. Кишечная палочка передается через загрязненную пищу или воду и может вызывать такие симптомы, как диарея, боли в животе и лихорадка.

Некоторые виды кишечной палочки способны вызывать различные инфекции, включая заболевания пищеварительной системы, инфекции

мочевыводящих путей и респираторные инфекции. Лечение таких инфекций обычно включает прием антибиотиков и поддерживающую терапию. Для профилактики следует соблюдать правила гигиены, правильно готовить и обращаться с пищей, а также избегать контакта с загрязненной водой [5].

В общем, *Escherichia coli* является важным объектом исследования в области микробиологии и иммунологии, из-за ее уникальных биологических свойств, которые могут быть как пользой, так и опасностью для человека. Кишечная палочка *Escherichia coli* - типичный представитель рода, представленный короткими палочками с закругленными концами, не образующими спор, грамотрицательные аэробы или факультативные анаэробы. У них есть разные формы, от подвижных к неподвижным, а также колониальные формы, которые могут быть бесцветными или окрашенными в различные цвета на агаре Эндо.

В целом, *Escherichia coli* является важным объектом изучения в микробиологии и иммунологии, так как она обладает уникальными биологическими свойствами и может быть как полезной, так и опасной для человека. *Escherichia coli*, известная также как кишечная палочка, представляет собой типичный вид, представленный короткими палочками с округлыми концами. Эти микробы не образуют споры и являются грамотрицательными аэробами или факультативными анаэробами. Они могут иметь различные формы, включая подвижные и неподвижные, иногда приближающиеся к коккам или принимающие вид длинных нитей. Их оптимальная температура для развития составляет 30-37°C, а уровень pH—7,2-7,5. Некоторые штаммы *Escherichia coli* на среде Эндо формируют колонии, которые могут быть бесцветными или окрашенными в розовый или красный цвет, со сверкающей или матовой поверхностью [1].

1.3 Строение клетки и клеточной стенки у *E.coli*

Штаммы *C. diphtheriae*, которые проживают на поврежденной коже человека, имеют гидрофобные клеточные стенки, в то время как более гидрофильные штаммы этого микроорганизма населяют слизистые ткани верхних дыхательных путей [17].

Механизм работы уникальных адгезивных структур грамотрицательных бактерий, включая пили из белков пилинов, опирается на сочетание гидрофобных и гидрофильных свойств, а также на уменьшение свободной поверхностной энергии [12].

Белок TiBP (Триизобутилфосфат) способствует специфической адгезии штамма *R. ruber* GIN1 к диоксиду титана благодаря его гидрофобным свойствам [14].

Некоторые археи также образуют специальные адгезивные структуры, которые помогают им связываться с различными природными материалами [19]. Каждый микроорганизм может использовать различные адгезивные факторы в зависимости от типа поверхности, условий выращивания и окружающей среды, поэтому универсального механизма адгезии не существует [4].

Клетка *E. coli* обладает типичной структурой, характерной для бактерий, и состоит из следующих основных компонентов:

Клеточная мембрана: Тонкая мембрана, состоящая из фосфолипидов и белков, образующая границу между клеткой и внешней средой. Она регулирует транспорт веществ внутрь и наружу клетки.

Цитоплазма – гелеобразная среда, заполненная растворенными веществами, молекулами и органеллами. В ней протекают основные биохимические реакции и синтез молекул, что обеспечивают жизнедеятельность клетки.

Нуклеоид – область цитоплазмы, где располагается хромосома бактерии, представляющая собой кольцевую молекулу ДНК, несущую генетическую информацию.

Рибосомы – органеллы, ответственные за синтез белков. Их можно рассматривать как молекулярные машины, которые участвуют в переводе генетической информации в белковые структуры.

Плазмиды – небольшие кольцевые молекулы ДНК, которые могут перемещаться между бактериями и содержат дополнительную генетическую информацию, дающие клетке дополнительные функции, например, устойчивость к антибиотикам.

Флагеллин – белковая структура, обеспечивающая подвижность клетки. Флагеллин вращается, позволяя бактерии перемещаться в окружающей среде.

Клеточная стенка – жесткая оболочка, окружающая клеточную мембрану, придающая клетке форму и защищающая ее от внешних воздействий.

Пили – мелкие волокнистые структуры, используемые для прикрепления к другим клеткам или поверхностям. Они играют важную роль в образовании биопленок и колонизации новых сред.

Все эти структуры работают в комплексе, обеспечивая жизнедеятельность, размножение и взаимодействие с окружающей средой бактерий *E. coli*. Строение клетки может варьироваться в зависимости от условий среды и стадии жизненного цикла бактерии.

Клеточная стенка *E. coli* представляет собой сложную структуру, состоящую из нескольких взаимосвязанных слоев, каждый из которых играет определенную роль в жизнедеятельности бактерии.

Внешний липополисахаридный слой (ЛПС) - это первый барьер, отделяющий клетку от внешней среды и состоит он из липидов и сахаров, выполняя защитную функцию, препятствуя проникновению бактериофагов и других вредных факторов.

Периплазматическая мембрана расположена между внешним ЛПС слоем и пептидогликановой структурой обеспечивая транспорт

питательных веществ в клетку и участвуя в рецепторных реакциях, осуществляя взаимодействие с окружающей средой.

Пептидогликановая структура - это каркас клеточной стенки *E. coli*, придающий ей прочность и жесткость. Она состоит из сети пептидных цепей, соединенных сахарными остатками, и играет ключевую роль в поддержании формы клетки, защищая её от внешних воздействий. Пептидогликан также участвует в процессах клеточного деления и роста.

Внутренняя мембрана отделяет цитоплазму клетки от периплазмы и служит барьером, регулирующим проникновение в клетку веществ, обеспечивая осмотическое равновесие, поддерживая устойчивость клеточного содержимого.

Взаимодействие всех этих слоев клеточной стенки обеспечивает *E. coli* устойчивость к внешним воздействиям, поддерживает ее форму и обеспечивает функциональность, необходимую для выживания и размножения.

1.4 Формирование биопленок бактериями *E.coli*

Основной способ, с помощью которого бактерии адаптируются к неблагоприятным условиям, заключается в формировании клеточных сообществ, таких как микробные агрегаты, флочки, гранулы, биопленки и маты. В этих обществах бактерии взаимодействуют друг с другом, собирают и используют питательные ресурсы, обмениваются сигнальными молекулами и генами, а также обеспечивают себя защитой от стрессовых факторов [6].

Процесс адгезии, которая представляет собой первый этап образования биопленок, микробных гранул и флоков при взаимодействии бактерий с поверхностью, играет ключевую роль в данном процессе. Механизмы адгезии, биологическое значение и факторы, влияющие на этот процесс, хорошо изучены у патогенных и условно-патогенных бактерий, но менее изучены у непатогенных прокариотов [7].

Формирование биопленок бактериями *E.coli* происходит в несколько этапов:

1. Присоединение и адгезия. В начале бактерии *E.coli* прикрепляются к различным поверхностям, таким как стекло, пластмасса или металл. Этот процесс определяется несколькими факторами, включая химические и физические характеристики поверхности, а также взаимодействия между бактериями и поверхностью на молекулярном уровне.
2. Первичная адгезия. Первоначальное прикрепление начинается, когда бактерии синтезируют внеклеточные полимеры, в том числе полимер слизи или экзополисахариды [9]. Эти полимеры привязывают бактерии к поверхности и обеспечивают начальную структуру биопленки.
3. Рост и зрелость биопленки. С течением времени бактерии начинают увеличивать плотность и размер биопленки, что приводит к формированию трехмерной структуры. Биопленка становится более устойчивой к разрушению и обеспечивает защиту бактерий от внешних факторов.
4. Дисперсия и распространение. При наличии определенных условий, биопленки могут диспергироваться и распространяться по поверхности или в окружающей среде, что позволяет бактериям *E.coli* колонизировать новые места и обеспечивает им выживание в различных условиях [9].

Неспецифические взаимодействия играют ключевую роль в адгезии как патогенных, так и непатогенных бактерий к различным поверхностям. Особенно значимыми представляются контакты с неорганическими поверхностями, такими как медицинские приборы, катетеры и протезы, а также с определенными живыми поверхностями, включая зубную эмаль.

Эти взаимодействия происходят из-за различных сил между молекулами. Различные молекулярные факторы, такие как внеклеточные полимерные вещества, адгезины, липополисахариды наружной мембраны грамотрицательных бактерий и полисахаридные межклеточные адгезины, играют важную роль в этом процессе [4].

Малоисследованна связь между бактериальной адгезией и рельефом клеточной поверхности, хотя имеется значительное количество исследований, посвященных влиянию рельефа подложки на процесс адгезии [8].

1.5 Влияние структуры поверхности для возможности прикрепления бактерий *E.coli*

Факторы структуры поверхности в значительной мере оказывают влияние на прикрепительную способность бактерии *E.coli*. Примерами таких факторов могут выступать: химический состав, рельеф, гидрофобность и топография. Например, микронеровности или пористая структура поверхности, могут создавать более благоприятные условия для адгезии бактерий, так как увеличивают поверхность контакта и обеспечивают больше места для крепления [23].

Гидрофобные поверхности, то есть поверхности, отталкивающие воду, также могут способствовать прикреплению бактерий *E.coli*, так как они имеют склонность к адсорбции и агрегации на таких поверхностях. С другой стороны, гидрофильные поверхности могут затруднять адгезию бактерий, так как могут быть менее привлекательными для присоединения.

Топография поверхности, включая наличие выступов, впадин, щелей, также может влиять на способность бактерий прикрепляться. Бактерии могут использовать эти структурные особенности для удержания на поверхности и образования биопленок [23].

Химический состав поверхности также играет важную роль. Например, поверхности с определенными химическими группами могут быть предпочтительнее для адгезии *E.coli*, ибо они могут образовывать прочные взаимодействия с молекулами бактерий. Кроме того, заряженность поверхности также может играть важную роль в адгезии. Например, если поверхность положительно или отрицательно заряжена,

это может способствовать привлечению бактерий с противоположным зарядом и уменьшить вероятность адгезии бактерий с тем же зарядом [6].

Исследования показывают, что поверхностное состояние титановых дентальных имплантатов имеет значительное влияние на адгезию бактерий.

Более грубые поверхности имплантатов из титана способствуют адгезии бактерий сильнее, что может увеличить риск развития инфекции и привести к неудачному результату имплантации. В статье приведены результаты, что с увеличением шероховатости поверхности наблюдалось увеличение адгезии *E. coli* [13].

1.6 Проблема зарастания материалов используемых в медицинской практике

Материалы на основе силикона и титана являются неотъемлемой частью медицинской практики, применяясь в самых разных областях, от инструментов для инъекций до имплантов и протезов. Однако, несмотря на строгие нормы асептики, проблема контаминации этих материалов остается актуальной, что может иметь серьезные последствия для пациентов.

Загрязнение медицинских материалов может привести к ряду негативных последствий. Например, инфицирование инструментов может стать причиной заражения пациента бактериями или вирусами, усугубляя его состояние. Загрязненные аналитические материалы могут исказить результаты исследований, что может привести к постановке неверных диагнозов и назначению неэффективного лечения [10].

Особо важную проблему представляет собой контаминация имплантов и протезов. Микроорганизмы, такие как бактерии, грибы и их споры, могут размножаться на поверхности этих материалов, вызывая ряд осложнений, включая замедленное заживление ран, инфекции, боль и другие неприятные симптомы [11].

Использование силикона и титана в медицинских имплантатах и протезах сталкивается с серьезной проблемой - риском их контаминации. Обеспечение чистоты и предотвращение загрязнения этих материалов требует пристального внимания и поиска оптимальных решений.

Для минимизации риска контаминации необходимо строго соблюдать асептику во время хирургических операций и медицинских процедур. Также крайне важно следить за состоянием имплантатов и протезов, обеспечивая надлежащий уход за ними.

Для стерилизации и дезинфекции применяются различные методы, каждый из которых обладает своими особенностями:

Автоклавирование, основанное на использовании высокого давления и пара, является наиболее распространенным методом. Обработка материалов в автоклавах при высокой температуре (121-134°C) уничтожает практически все микроорганизмы, включая бактерии, вирусы и споры. Однако этот метод не всегда подходит для силиконовых изделий.

Химическая стерилизация предполагает обработку инструментов химическими растворами или газами. Часто применяются такие вещества, как пероксид водорода, глутаральдегид или оксид этилена.

Ультрафиолетовая обработка основана на использовании ультрафиолетового излучения для уничтожения микроорганизмов. Инструменты облучаются в специальных камерах или шкафах с ультрафиолетовыми лампами.

Каждый из этих методов имеет свои плюсы и минусы, и выбор подходящего метода зависит от типа инструмента, материала и требуемого уровня стерилизации. В медицинских учреждениях, как правило, применяют комбинацию различных методов стерилизации, чтобы обеспечить максимальную защиту от инфекций и надлежащий контроль за состоянием медицинских инструментов.

Обеспечение стерильности в медицинских учреждениях - задача первостепенной важности. Не только во время проведения операций, но и

при рутинных процедурах, соблюдение правил гигиены и асептики является ключевым фактором для предотвращения инфекций и повышения безопасности пациентов.

Широкое применение материалов, таких как силикон и титан, в медицинских учреждениях (шприцы, иглы, перчатки, катетеры, емкости для анализов) порождает новые вызовы. Несмотря на соблюдение мер асептики, риск контаминации медицинских материалов остается актуальным.

Загрязнение инструментов может привести к инфекционным осложнениям у пациентов, а искажение результатов анализов - к ошибочной диагностике и лечению.

Особую опасность представляет контаминация имплантов и протезов. Развитие микрофлоры на их поверхности может привести к замедлению заживления ран, возникновению инфекций, болевым ощущениям и другим осложнениям.

Для предотвращения этих проблем необходим строгий контроль за стерильностью инструментов и правильным уходом за имплантатами. В арсенале медицинских учреждений - широкий спектр методов стерилизации и дезинфекции: автоклавирование, обработка ультрафиолетовым излучением, применение антисептических средств [11].

Только комплексный подход, включающий соблюдение всех санитарно-гигиенических норм, позволит минимизировать риск контаминации и обеспечить безопасность пациентов.

Стерилизация – это ключевой аспект медицинской практики, направленный на уничтожение всех микроорганизмов, включая бактерии, вирусы и споры, с поверхности инструментов и материалов. Существуют различные методы стерилизации, каждый из которых имеет свои особенности и области применения.

Автоклавирование - один из наиболее распространенных методов. Он основан на воздействии пара под высоким давлением, что обеспечивает

эффективное уничтожение микроорганизмов при температуре 121-134 градусов Цельсия. Несмотря на свою эффективность, автоклавирование может быть не подходит для материалов из силикона.

Химическая стерилизация использует химические растворы или газы для уничтожения микроорганизмов. К наиболее распространенным химическим агентам относятся пероксид водорода, глутаральдегид и оксид этилена.

Ультрафиолетовая обработка использует ультрафиолетовое излучение для уничтожения микроорганизмов. Для этого инструменты помещаются в специальные камеры или шкафы, где облучаются ультрафиолетовым светом.

Выбор оптимального метода стерилизации зависит от типа инструмента, его материала, а также требуемого уровня стерилизации. В медицинских учреждениях обычно применяют комбинацию различных методов для обеспечения максимальной безопасности и контроля за состоянием инструментов [21].

Важным дополнением к стерилизации является соблюдение правил гигиены и асептики при проведении медицинских процедур и операций. Это позволяет минимизировать риск инфекций и обеспечить максимальную безопасность пациентов.

1.7 Различные способы маркировки бактерий

Метод Грама, один из методов маркировки бактерий, что позволяет разделить их на две основные группы – грамположительные и грамотрицательные. После окрашивания бактерии грамположительные будут иметь фиолетовый цвет, а грамотрицательные - красный или розовый.

Процесс сложного окрашивания по Грамму:

1. Делают мазок бактерий на подготовленном предметном стекле и высушивают на воздухе. Фиксируют мазок на спиртовой горелке.

2. На фиксированный мазок наносят основной краситель на 1 мин.
3. По истечении времени, сливают основной краситель и промывают препарат водой.
4. Наносят на препарат раствор Люголя на 1 мин., после чего промывают водой и высушивают на воздухе.
5. Обесцвечивают препарат спиртом в течение 30 сек. и просушивают.
6. Окрашивают дополнительным красителем, 15 сек., промывают, высушивают и делают микроскопию мазка.

Этот метод важен для диагностики и лечения инфекционных заболеваний в ежедневной практике лабораторий, но нельзя будет наблюдать за живыми бактериями, ведь в процессе окрашивания они проходят фиксацию на горелке и обесцвечивание спиртом.

Флуоресцентная маркировка: использование флуорофоров для окраски бактерий и их последующее определение с помощью флуоресцентного микроскопа, маркированные бактерии светятся под определенной длиной волны. Данный метод позволяет визуализировать и отслеживать движение бактерий под микроскопом.

Этапы флуоресцентной маркировки бактерий обычно включают следующие шаги:

1. Фиксация бактерий - клетки фиксируются на поверхности, чтобы обеспечить их сохранность и сохранить структуру клеток.
2. Проникновение флуоресцентного маркера - флуоресцентный маркер вводится в клетки, либо через обработку клеток специальными растворами, либо генетическими методами.
3. Микроскопическое исследование - маркированные клетки подвергаются микроскопическому анализу для визуализации и изучения.

Плюсы флуоресцентной маркировки бактерий:

1. Высокая чувствительность и специфичность - метод позволяет обнаруживать и визуализировать отдельные клетки бактерий с высокой точностью.

2. Возможность количественного анализа - флуоресцентная маркировка позволяет определить количество и распределение клеток в образце.

3. Автоматизация и высокая скорость анализа - метод можно автоматизировать и использовать для быстрого анализа больших объемов образцов.

Минусы флуоресцентной маркировки бактерий:

1. Необходимость специализированного оборудования и реагентов, что может увеличить стоимость и сложность проведения метода.

2. Возможность перекрытия сигнала - при использовании нескольких флуоресцентных маркеров одновременно, сигналы могут перекрываться и затруднять интерпретацию результатов.

3. Возможность повреждения клеток - процедуры фиксации и проникновения маркеров могут повредить клетки и исказить результаты исследования.

Иммунофлуоресцентная маркировка: применение антител, меченных флуорофорами, для определения конкретных бактерий или их компонентов.

Этапы метода иммунофлуоресцентной маркировки бактерий включают в себя:

1. Подготовка образцов бактерий для анализа.

2. Фиксация бактерий на подготовленных носителях.

3. Инкубация с антителами, специфичными для бактерий.

4. Промывка образцов для удаления несвязанных антител.

5. Наблюдение и фиксация флуоресцентного сигнала под микроскопом.

Плюсы метода иммунофлуоресцентной маркировки бактерий:

1. Высокая специфичность и чувствительность - метод позволяет точно идентифицировать бактерии на уровне отдельных клеток.

2. Визуализация - визуализация флуоресцентного сигнала позволяет легко определить местонахождение бактерий в образце.

3. Мультиплексная маркировка - возможность одновременной маркировки нескольких видов бактерий с использованием различных флуорохромов.

Минусы метода иммунофлуоресцентной маркировки бактерий:

1. Сложность - требуется специализированное оборудование и навыки для проведения данного метода.
2. Ограничения в выборе антител - необходимость наличия специфических антител для конкретных видов бактерий.
3. Возможность ложноположительных результатов - несоответствие между антителами и бактериями или неспецифическое связывание антител.

Рентгенографическая маркировка: использование рентгеновского излучения для визуализации маркированных бактерий. Позволяет пометить бактерии радиоактивными изотопами и затем отслеживать их перемещение в организме с помощью рентгеновского облучения.

Этапы проведения рентгенографической маркировки бактерий:

1. Выбор радиоактивного изотопа для маркировки бактерий.
2. Подготовка бактерий к маркировке, например, путем инкубации в среде с радиоактивным изотопом.
3. Изучение перемещения и распределения маркированных бактерий с помощью рентгеновского облучения.

Плюсы метода рентгенографической маркировки бактерий:

1. Позволяет изучать живые бактерии в реальном времени.
2. Дает возможность отслеживать миграцию бактерий в организме и определить места их скопления.
3. Помогает понять пути распространения инфекционных болезней и разрабатывать методы их преодоления.

Минусы метода рентгенографической маркировки бактерий:

1. Использование радиоактивных изотопов может быть опасно для здоровья и требует соблюдения всех мер предосторожности.

2. Требуется специальное оборудование и грамотное обучение для проведения и анализа данных исследования.

3. Не всегда возможно точно определить местоположение радиомаркированных бактерий из-за их малого размера и сложной структуры.

Данный метод позволяет изучать поведение бактерий в организме, но требует серьезного подхода к проведению и анализу данных.

Маркировка с использованием золотых наночастиц: наночастицы золота используются для маркировки бактерий и последующей визуализации с помощью электронного микроскопа. Наночастиц золота являются отличными маркерами из-за своей уникальной оптической и электронной активности.

Этапы данного метода:

1. Подготовка золотых наночастиц: золотые наночастицы размером около 5-100 нм синтезируются и функционализируются для обеспечения их стабильности и специфического связывания с бактериями.

2. Маркировка бактерий: функционализованные золотые наночастицы наносятся на поверхность бактерий либо используются для маркировки антител или ДНК-проб, которые связываются с бактерией.

3. Визуализация и анализ: маркированные бактерии визуализируются с помощью микроскопии или других методов анализа, что позволяет определить местоположение и количество бактерий.

Плюсы метода:

1. Высокая чувствительность и специфичность: золотые наночастицы обладают высокой оптической активностью, что позволяет детектировать даже небольшие количества бактерий.

2. Быстрая и простая процедура: маркировка бактерий с использованием золотых наночастиц не требует сложных техник и может быть выполнена быстро.

3. Возможность мультиплексирования: разные типы золотых наночастиц могут быть использованы для мультиплексирования различных бактерий или маркеров.

Минусы метода:

1. Токсичность: золотые наночастицы могут обладать токсическим действием на бактерии, что может повлиять на результаты анализа.

2. Сложность интерпретации: иногда затруднительно интерпретировать результаты маркировки из-за возможности неправильного связывания наночастиц с другими молекулами.

3. Стоимость: синтез и функционализация золотых наночастиц может быть дорогим процессом, что делает этот метод менее доступным для использования в широком масштабе.

Маркировка с использованием флуоресцентного белка (FP): генетическое введение FP в бактерию для обозначения ее в живых клетках.

В данной работе был использован метод маркировки бактерий с использованием флуоресцентного белка Turbo RFP. Флуоресцентный краситель Turbo RFP (Red Fluorescens Protein) используется для маркировки бактерий в молекулярно-биологических исследованиях. Для этого красителя разработаны векторы, которые содержат ген, кодирующий Turbo RFP, и позволяют интегрировать его в геном бактерий.

Полученный на основе природного белка из морского анемона *Entacmaea quadricolor* [18], флуоресцентный краситель TurboRFP обладает высокой фотостабильностью и рН стабильностью, превосходящей более чем в два раза белок DsRed2. В отличие от других белков группы DsRed (DsRed2, DsRed-Express), экспрессия TurboRFP в клетках млекопитающих не приводит к артефактному накоплению репортера в аппарате Гольджи при длительной экспрессии.

Плюсами данного белка являются быстрое созревание при 37°C, сверхъяркая флуоресценция с пиками возбуждения и эмиссии при 553 и

574 нм и высокая стабильность при изменении pH (pKa 4,4) и фотостабильность [18].

Благодаря быстрому созреванию данный белок находится в клетках через 8 часов и может использоваться для мониторинга быстрых изменений активности промоторов, а в живых системах используется дестабилизированная версия TurboRFP с коротким полупериодом распада.

Минусом данного белка является склонность к димеризации, но он может использоваться для маркировки клеточных органелл и изучения локализации белков.

Чтобы использовать флуоресцентный краситель Turbo RFP для маркировки бактерий, необходимо внести вектор с геном Turbo RFP в бактерию с помощью методов трансформации. После интеграции гена в геном бактерии, клетки начинают синтезировать Turbo RFP, что приводит к свечению красным цветом под воздействием определенного спектра света.

Таким образом, можно визуализировать и отслеживать бактерии с помощью флуоресцентного красителя Turbo RFP в различных экспериментах.

1.8 Микроскопирование в микробиологии

Микроскопирование — это метод обнаружения и идентификации микроорганизмов с использованием микроскопа. Данный метод позволяет идентифицировать различные виды микроорганизмов, определять их форму, размер, движение и другие характеристики, а также широко используется в микробиологии для исследования бактерий, вирусов, грибов и других микроорганизмов.

Для микроскопирования образцы микроорганизмов наносят на предметное стекло, затем окрашивают специальными красителями, чтобы улучшить контрастность и визуализацию клеток. После, предметное стекло помещается под микроскоп для изучения.

В зависимости от области исследования и типу работы, микроскопы различаются.

Световой микроскоп: использует для исследований, основанных на использовании света для увеличения и изучения мельчайших объектов, невидимых невооруженным глазом. В световом микроскопе имеется источник света, который освещает образец и позволяет увидеть его под большим увеличением.

Основными компонентами светового микроскопа являются: объектив и окуляр, которые работают вместе для увеличения препарата. Объектив собирает свет и увеличивает образец, передавая изображение на окуляр, где оно увеличивается еще больше для наблюдения.

Плюсы светового микроскопа:

1. Простота использования - световые микроскопы легко настраивать и использовать.
2. Удобство - такие микроскопы компактны и легки, что делает их удобными для использования в лабораторных условиях.
3. Высокое качество изображения - световой микроскоп позволяет получать четкие и детальные изображения объектов.

Минусы светового микроскопа:

1. Ограниченное увеличение - световой микроскоп имеет ограничение в увеличении, что может быть недостаточно для некоторых исследований.
2. Ограниченная разрешающая способность - разрешение светового микроскопа не такое высокое, как у электронного микроскопа, что может ограничить возможности детального изучения некоторых объектов.
3. Оптические микроскопы требуют дополнительного источника освещения для работы. Это может вызывать сложности в условиях с недостаточным освещением.

Электронные микроскопы используют пучок электронов для создания изображений. Существуют два главных типа: сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) и трансмиссионный электронный

микроскоп (ТЭМ). С помощью электронных микроскопов, мы можем получать изображения с высоким разрешением.

Преимущества:

1. Высокое разрешение: электронные микроскопы позволяют получить высокодетализированные изображения раскрывая структуру объектов в нанометрах для детального изучения.
2. Исследование непрозрачных материалов: они могут анализировать объекты, не пропускающие свет, расширяя спектр исследуемых материалов без повреждения образца.
3. Спектральный анализ: возможность изучения состава и свойств материалов благодаря анализу спектра прошедшему через образец (поглощенного и отраженного) и определение, какие цвета спектра, следовательно компоненты, присутствуют.

Недостатки:

1. Сложность и стоимость: довольно сложные и дорогостоящие инструменты, требующие специальных помещений, квалифицированных специалистов для эксплуатации и обслуживания.
2. Ограничения по типу образцов: некоторые образцы не подходят для работы с электронным микроскопом из-за несовместимости с вакуумной средой. Помимо этого, для проведения микроскопии исследуемые материалы должны соответствовать определенной толщине.
3. Опасность: при работе с электронным микроскопом необходимо соблюдать меры безопасности и правила работы с таким оборудованием, в противном случае это может сулить ожогами и повреждением роговицы глаза из-за выпущенного электронного пучка.

Флуоресцентная микроскопия – это метод, использующий флуоресценцию для визуализации биологических структур и процессов. В основе этого метода лежит явление флуоресценции, где определенные молекулы, называемые флуорофорами, поглощают свет определенной длины волны и испускают свет с большей длиной волны.

Преимущества флуоресцентной микроскопии:

1. Флуоресценция позволяет детектировать очень низкие концентрации флуорофоров.
2. Флуорофоры могут быть специфично связаны с определенными структурами, например, с белками, ДНК или мембранами.
3. На флуоресцентном микроскопе можно получать трехмерные изображения образцов и изучать динамические процессы в живых клетках.

Недостатки флуоресцентной микроскопии:

1. Флуорофоры постепенно теряют способность флуоресцировать под воздействием света, поэтому имеется ограничение во времени эксплуатации с последствиями в виде искажения результатов.
2. Как приобретение, так и обслуживание флуоресцентных микроскопов является дорогостоящим.
3. Некоторые образцы могут обладать собственной флуоресценцией, что может мешать наблюдению за детекцией основных сигналов.
4. Как и у всех световых микроскопов, разрешение флуоресцентного микроскопа ограничено дифракционным пределом света, что не позволяет получать изображения с разрешением менее 200 нм.

Флуоресцентная микроскопия хороший инструмент для исследователей потому, что имеет широкое признание в изучение клеточных структур и наноструктур.

Конфокальный микроскоп - это тип микроскопа, позволяющий получать трехмерные изображения образца путем послойного сканирования объекта и создания изображения с высоким разрешением и четкостью. Его применение широко распространено в биологии, медицине и материаловедении.

Данный микроскоп использует лазерный луч, фокусируясь в одной точке, после сканирует объект по линии или плоскости, создавая серию точечных измерений. Затем, детектор регистрирует свет, испускаемый

объектом, только в фокальной плоскости. Собранные детекторами информация загружается на компьютер и формируется изображение.

Преимущества конфокального микроскопа:

1. Высокое разрешение. Благодаря фокусировке света на одной точке, а не на всем образце.
2. Специальная конфокальная апертура минимизирует шумы и фоновые сигналы, что приводит к получению качественных изображений.
3. Трехмерная визуализация, получение трехмерных изображений.

Недостатки конфокального микроскопа:

1. Малодоступны для многих лабораторий из-за высокой стоимости в сравнении со стандартным оптическим микроскопом.
2. Для оптимальной работы на данном устройстве, требуется определенный уровень знаний и навыков.
3. Сканирование проводится довольно медленно, особенно при высоких разрешениях.
4. Ограниченное поле зрения и сложность в обработке данных без специального программного обеспечения.

Поляризационный микроскоп позволяет изучать структуру и свойства материалов пропускающих свет, в основном используют для изучения кристаллов.

Свет от источника проходит через первый поляризатор, становясь поляризованным. Поляризационный свет проходит через образец, если это, например, стекло, то свет пройдет через него без изменений. При прохождении света через кристалл, свет разделяется на два луча, поляризованных в разных направлениях. Данные лучи проходят через второй поляризатор (анализатор) и в зависимости от ориентации анализатора относительно поляризатора, один из лучей будет заблокирован, а другой пройдет, создавая изображение.

Преимущества поляриметрического микроскопа:

1. Можно наблюдать оптические свойства материалов, интерференционный свет и оптическую анизотропию.
2. Позволяет видеть свойства материалов неразличимые в обычном свете.
3. Позволяет изучать оптическую активность образцов, например, вращение плоскости поляризации света.

Недостатки поляриметрического микроскопа:

1. Настройка и работа с поляриметрическим микроскопом сложнее, чем с обычным микроскопом, поэтому требуются навыки и время для настройки перед микроскопией.
2. Дорогостоящее оборудование и обслуживание.
3. Из-за внешних факторов, в виде помех в окружающей среде, может не получиться четкого изображения и точных данных.

В целом, выбор микроскопа зависит от конкретных целей исследования и доступных ресурсов.

Атомно-силовой микроскоп, АФМ – это тип сканирующего зондового микроскопа, использующие острое прикрепленное к лучу для сканирования поверхности образца.

Острие, обычно изготавливаемое из кремния или нитрида кремния с закруглениями в 10-100 нм. Оно прикреплено к лучу, перемещающемуся по поверхности исследуемого образца. Лучу передается движение в виде раstra на поверхности образца, а острие сканирует поверхность. Между острием и образцом возникают силы взаимодействия, измеряемые датчиком, а получаемый сигнал используется для управления лучом и получения обратной связи. Фиксирую высоту луча, получается трехмерное изображение.

Преимущества АФМ:

1. Высокое разрешение, позволяет получить изображения с разрешением до нескольких ангстрем, позволяя визуализировать отдельные атомы.

2. Многофункциональность объясняется возможностью использования различных материалов, включая проводники, полупроводники, металлы, полимеры и биологические образцы.

3. Разнообразие режимов, можно работать в контактном, бесконтактном, касательном и других режимах.

Недостатки AFM:

1. Имеет ограничения по размерам образцов, они должны подходить под платформу микроскопа.

2. Скорость сканирования относительно медленная, так как острие сканирует поверхность по строкам, из-за чего требует времени.

3. Острие может деформировать материал.

4. Сложная калибровка и эксплуатация.

Данный микроскоп используют для высокоточного анализа поверхности.

Сверхразрешающий оптический микроскоп (SR-микроскоп) использует инновационные методы для преодоления дифракционного предела обычного оптического микроскопа, достигая разрешения в несколько нанометров.

Обычная световая микроскопия ограничена дифракционным пределом, который определяет минимальное расстояние, на котором два объекта могут быть различимы. Этот предел равен примерно половине длины волны используемого света. Для видимого света это означает, что объекты меньше 200 нанометров мы не увидим.

Сверхразрешающие микроскопы (SR) преодолевают этот предел, используя различные техники, которые позволяют "увидеть" объекты меньше дифракционного предела. Некоторые из основных методов:

STED-микроскопия (Stimulated Emission Depletion) использует лазерный луч для подавления флуоресценции молекул за пределами маленькой области, позволяя получить изображение с разрешением менее 20 нанометров.

PALM/STORM-микроскопия (Photoactivated Localization Microscopy/Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) применяет флуоресцентные молекулы, активирующиеся случайным образом, позволяя точно определить их положение. Затем изображения состояются из множества таких локализаций, давая разрешение в 20 нанометров.

SIM-микроскопия (Structured Illumination Microscopy) использует структурированный световой пучок для освещения образцов с определенными узорами на поверхности. Затем, полученные изображения используются для восстановления изображения с более высоким разрешением.

Преимущества SR-микроскопа:

1. Позволяет наблюдать объекты, недоступные для классического оптического микроскопа, не требуя специальной обработки для исследования.
2. Дает более детальную информации о структуре и особенностях объекта.
3. Неинвазивный метод, можно изучать живые образцы.

Недостатки SR-микроскопа:

1. Время сканирования замедляет процесс работы в отличие от традиционной микроскопии.
2. Не все методы данной микроскопии эффективны ввиду наличия своих ограничений и областей применения.

Существует множество различных типов микроскопов, каждый из которых подходит для определенных задач. В зависимости от свойств исследуемого образца, необходимой степени детализации и доступного оборудования, выбор того или иного микроскопа становится ключевым фактором успешного исследования.

В данной работе исследовались непрозрачные образцы, в связи с чем не представлялось возможным использование обычного светового

микроскопа, поэтому работа проводилась с использованием флуоресцентного метода микроскопии.

Для отслеживания процесса зарастания материалом бактерий мы воспользовались методом прижизненного окрашивания флуоресцентными белками, полученными путем трансформации плазмидой, содержащей ген красного флуоресцентного белка TurboRFP. Этот метод позволил нам обнаруживать микроорганизмы на поверхности непрозрачных материалов без необходимости фиксации и последующего окрашивания, чтобы избежать возможного воздействия на структуру исследуемого материала.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методика проведения на образце титана

Приготовление жидкой питательной среды для культивирования бактерий *E.coli*. Культивирование бактерий происходило в среде лизогенного бульона.

Состав лизогенного бульона:

1. Триптон 0,5 г
2. Дрожжевой экстракт 0,25 г
3. Натрий хлористый 0,25 г
4. Дистиллированная вода 50 мл

Перечисленные компоненты среды смешивались в дистиллированной воде и перемешивались до гомогенного состояния. Среда автоклавировалась в течение 30 минут. После остывания в среду добавлялся антибиотик Гентамицин (9,375 мкл).

Посев меченых бактерий, *E.coli*, красным флуоресцентным белком TurboRFP проводился после полного остывания питательной среды. В ламинарном боксе, стерильной петлей, производился забор бактерий и точно, под небольшим наклоном колбы, наносилась культура бактерий *E.coli* XL-blue. Среда культивировалась в термошейкере при 28°C в течение суток.

Состав плотной питательной среды:

1. Триптон 1 г
2. Экстракт дрожжей 0,5 г
3. NaCl 0,5 г
4. Агар 2 г
5. Дистиллированная вода 100 мл

Приготовление питательной среды:

1. Триптон, экстракт дрожжей и NaCl размешивали в 100 мл дистиллированной воды и перемешивали до полного растворения.

2. После добавлялся агар и перемешивался до равномерного распределения.
3. Полученную среду разливали по чашкам Петри, после остывания закрыть крышкой и стерилизовать в автоклаве при 121°C в течение 15-20 минут.
4. После стерилизации ожидали остывания до температуры, пригодной для посева бактерий.

Посев бактерий проводился в ламинарном боксе стерильной петлей. Для равномерного роста бактериальных колоний материал распределялся равномерно зигзагообразно.

Предварительная стерилизация образцов из титана перед нанесением бактериальной культуры.

Образцы помещались в пробирки с раствором, состоящим из:

1. Дистиллированная вода 5 мл
2. Детергент (7х) 10 мкл

Раствор для ультразвуковой ванны:

1. Дистиллированная вода 800мл
2. Детергент 1 мл

Промывание проводилось при настройках: время – 10 минут, температура – 25 °С.

После, в ламинарном боксе, подсушенные образцы помещались в 70% спирт на 1 час, по истечении времени, титановые пластинки промывались в стерильной воде трижды для удаления остатка спирта и находились под ультрафиолетовой лампой в течение 5 минут.

На поверхность титанового образца наносили бактерии *E.coli* для проверки антибактериальной способности. Для визуальной оценки степени адгезии бактерий к образцу, использовали рекомбинантные штаммы *E.coli*, которые были помечены красным флуоресцентным белком TurboRFP. В колбу, с лизогенным бульоном, помещали образцы титана с обработанной и не обработанной поверхностями (рисунок 1).



Рисунок 1 – Слева культура бактерий *E.coli* меченные красным флуоресцентным белком TurboRFP. Справа, образец из титана помещенный в суспензию бактерий *E.coli*

Далее шло наращивание бактериальной культуры на поверхности наноструктурированного титана в термошейкере в течение суток при температуре 37°C. После 24 часов культивирования титановых пластинок в суспензии бактерий, образцы промывали трижды в стерильной воде, для предотвращения налипания не прикрепившихся бактериальных клеток.

После промывания образцы высушивали и прикрепляли к предметному стеклу на двусторонний скотч (рисунок 2).



Рисунок 2 – Образцы титана с наноструктурированной поверхностью. Номера 1,4 – обработанная поверхность, номера 2,3 – поверхность не обработана

Анализировали степени адгезии бактерий с помощью флуоресцентного микроскопа Biozero BZ-8100 (Keyence, Япония) (рисунок 3) с использованием светофильтров, подобранных для определения красного флуоресцентного белка (возбуждение 540/25 нм, излучение

605/55 нм) [9]. Использовались два объектива (20x и 4x) для наблюдения с различным увеличением.

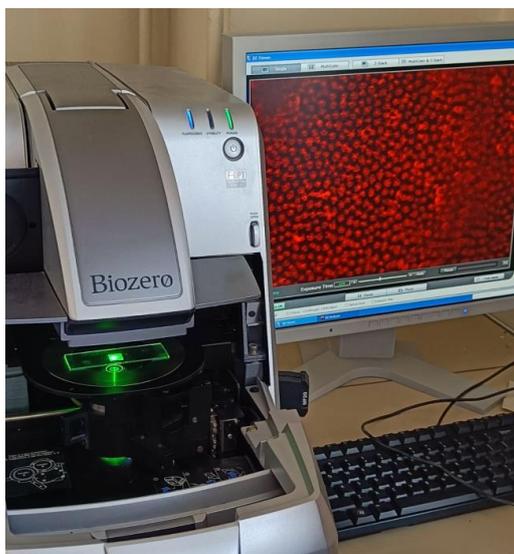


Рисунок 3 – Флуоресцентный микроскоп Biozero BZ-8100 (Keyence, Япония)

2.2. Методики проведения на образце силикона

Бактерии культивировались в среде лизогенного бульона. Триптон (0,5 г), дрожжевой экстракт (0,25 г), натрий хлористый (0,25 г) и дистиллированная вода (50 мл) смешивались в колбе до гомогенного состояния. Среда автоклавировалась в течение 30 минут (рисунок 4). После остывания в среду добавлялся антибиотик Гентамицин (9,375 мкл).



Рисунок 4 – Автоклав для стерилизации сред и лабораторного оборудования

Посев меченых бактерий, *E.coli*, красным флуоресцентным белком TurboRFP проводился после полного остывания питательной среды. В ламинарном боксе с использованием стерильной петли, были взяты бактерии и нанесены точечно, под небольшим углом, на дно колбы со средой. Далее среда была инкубирована в термошейкере при 28°C в течение суток.

Для проведения исследований использовались образцы силикона без модификаций и с нанопокрытиями (рисунок 5).

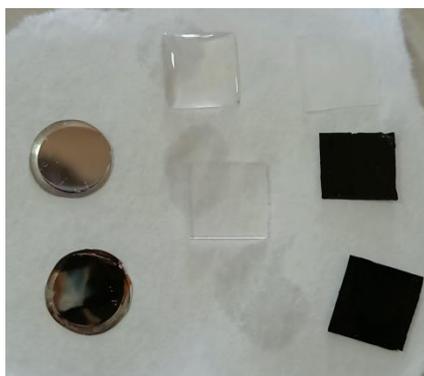


Рисунок 5 – Образцы из титана и силикона с обработанными и не обработанными поверхностями

Силикон предварительно стерилизовали в пластиковых пробирках с дистиллированной водой (5 мл) и детергентом (100 мкл). Пробирки с образцами встряхивали и оставляли на 10 минут, по истечении времени пятикратно промывали стерильной водой для удаления остатков детергента. В ламинарном боксе обмакивали в 70% спирт и дважды промывали в воде, далее оставляли под ультрафиолетовой лампой на 5 минут.

Образцы выкладывали на дно чашки Петри, или стеклянной колбы, и заливали средой (2 мл) с помощью автоматической пипетки, с культурой бактерий *E.coli*, которая была помечена флуоресцентным белком и инкубировали при 37°C в течении 4 часов в термошейкере (рисунок 6).

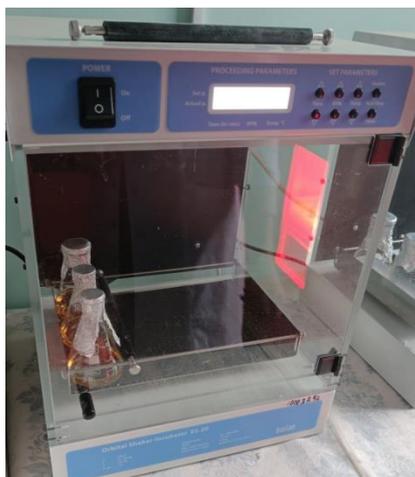


Рисунок 6 – Термошейкер с образцами в культурах бактерий *E.coli*

После этого образцы трижды промывались в дистиллированной воде для удаления не налипших бактерий, высушивали и распределяли на предметном стекле для дальнейшего микроскопирования. Микроскопия проводилась с использованием флуоресцентного прибора Biozero VZ-8100 Микроскоп (Кеуенсе, Япония).

Для повторного использования, образцы подвергались стерилизации в ультразвуковой ванне (рисунок 7) при следующих настройках: температура 25-26°C в течении 10 минут. Раствор из 800 мл дистиллированной воды и 1 мл семикса (7х).



Рисунок 7 – Ультразвуковая ванна для отмывания образцов

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Современная медицина активно использует разнообразные материалы для изготовления медицинских инструментов, приспособлений, имплантов и других изделий. Одним из ключевых аспектов их применения является предотвращение прикрепления бактерий к таким поверхностям, так как это может негативно повлиять на здоровье пациентов. Из исследований известно, что способность бактерий к адгезии на различных поверхностях зависит от их структуры. В настоящее время многие ученые по всему миру работают над созданием структуры поверхности медицинских материалов и инструментов, которая исключила бы возможность адгезии бактерий и образования биопленок на них.

В рамках исследования были проведены эксперименты с использованием различных материалов, широко применяемых в области медицины, таких как силикон и титан. Целью исследования было изучение адгезии бактерий *E.coli* на поверхности этих материалов и оценка воздействия модификаций поверхности на прикрепление бактерий к ним.

В ходе первой части исследования были проведены эксперименты с различными модификациями поверхности силикона. Для отслеживания процесса зарастания материалом бактерий мы воспользовались методом прижизненного окрашивания флуоресцентными белками, полученными путем трансформации плазмидой, содержащей ген красного флуоресцентного белка TurboRFP. Это метод позволил нам обнаруживать микроорганизмы на поверхности непрозрачных материалов без необходимости фиксации и последующего окрашивания, чтобы избежать возможного воздействия на структуру исследуемого материала.

Вначале был analyzed образец силикона без модификации поверхности (рисунок 8).

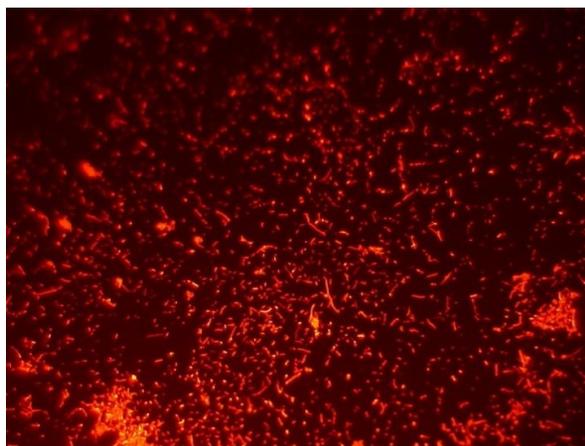


Рисунок 8 – Бактерии на поверхности немодифицированного кремния. Флуоресцентная микроскопия (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Из полученного снимка видно, что поверхность образца содержит большое количество бактерий, это говорит нам о том, что микроорганизмы довольно хорошо адгезируются на немодифицированной поверхности кремния.

В дальнейшем нами были проведены проверки образцов кремния, на поверхности которых были созданы специальные структуры с использованием метода литографии в Московском физико-техническом институте. Эти структуры могли потенциально снизить адгезию и рост бактерий на поверхности таких образцов. Образец А имеет следующую поверхность (рисунок 9).

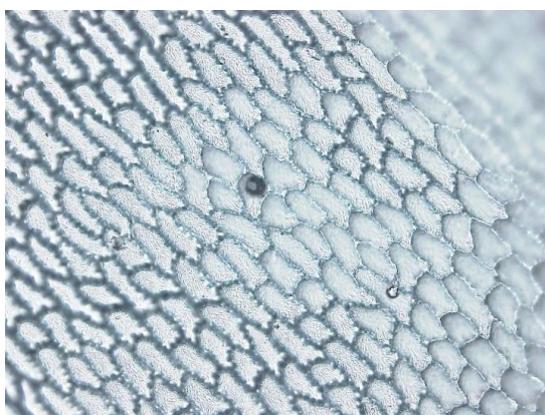


Рисунок 9 – Образец А. Форма модифицированной поверхности кремния методом литографии. Световая микроскопия

Данный образец был обработан суспензией бактерий, после чего поверхность была анализирована с помощью флуоресцентного микроскопа (рисунок 10). Фотографии под флуоресцентным свечением с двукратным наложением во флуоресцентном и проходящем свете.

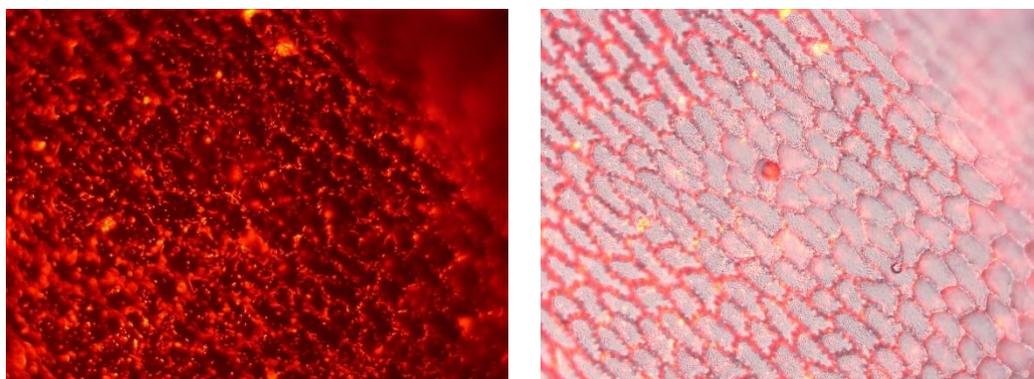


Рисунок 10 – Образец А. Флуоресцентная микроскопия модифицированной поверхности силикона. Красные зоны соответствуют автофлуоресценции (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм).

Из результатов видно, что данная форма образца не повлияла на степень адгезии бактерий. Бактерии в большей степени адгезируются в углублениях между образованными бугорками.

Образец М. Данный образец имеет следующую поверхность (рисунок 11).



Рис 11 – Образец М. Модифицированная поверхность силикона методом литографии. Световая микроскопия

Данный образец также был обработан суспензией бактерий и анализирован с помощью флуоресцентной микроскопии (рисунок 12).

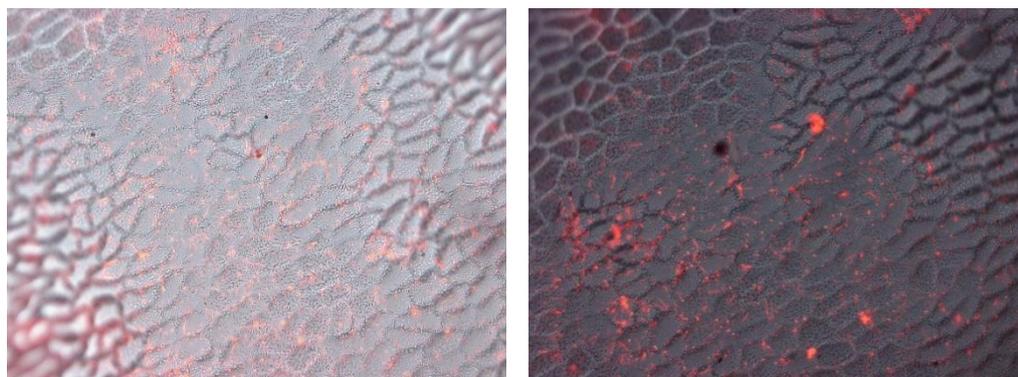


Рисунок 12 – Образец М. Флуоресцентная микроскопия модифицированной поверхности (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Из полученных данных видно, что данный вариант поверхности менее подвержен адгезии бактериями, хотя на поверхности также наблюдается значительное количество микроорганизмов.

Образец R. Данный образец имеет следующую поверхность (рисунок 13).

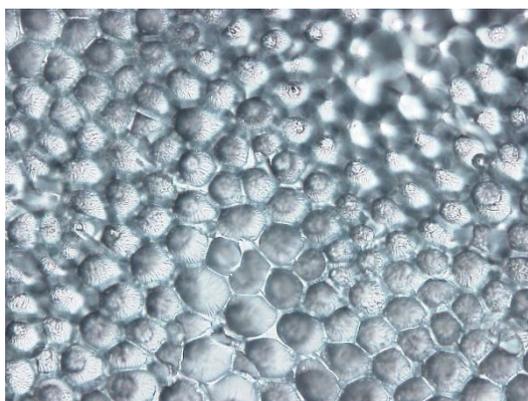


Рисунок 13 – Образец R. Световая микроскопия

При анализе поверхности после обработки бактериями было выявлено, что данная структура еще больше влияет на адгезию бактерий (рисунок 14).



Рисунок 14 – Образец R. Флуоресцентная микроскопия модифицированной поверхности (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Также наблюдается, что большая часть бактерий прикрепляется в складках между бугорками, тогда как на поверхности самих выпячиваний бактерий практически не наблюдается.

Образец Р. Данный вид модификации отличается наибольшим снижением адгезии бактерий на поверхности силикона (рисунок 15).

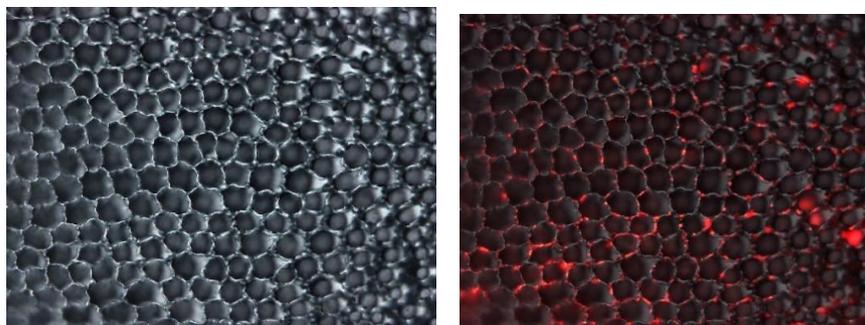


Рисунок 15 – Образец Р. Флуоресцентная микроскопия модифицированной поверхности (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

В складках между бугорками обнаружено некоторое количество бактерий. Количество адгезировавшихся микроорганизмов заметно ниже, чем на необработанной поверхности. Это позволяет сделать вывод, что изменение структуры поверхности силиконового материала способно

обеспечить антибактериальный эффект, который помешает зарастанию бактериями материалов.

Силиконовые имплантаты широко применяются в пластической и реконструктивной медицине, но могут вызывать серьезные инфекции из-за бактериальной адгезии и роста биопленки на поверхности. Разработка новых антибактериальных наноструктурированных поверхностей считается наиболее перспективным подходом к решению этой проблемы. Данное исследование демонстрирует влияние наноструктурирования на антибактериальные свойства поверхностей из силикона.

Титан широко применяется в медицинской сфере для создания различных имплантатов и медицинских устройств. Однако возникает проблема контаминации и роста микроорганизмов на поверхности имплантатов, что может привести к различным осложнениям, таким как инфекции, болевые ощущения и замедление заживления ран. Для поиска путей придания имплантатам антибактериальных свойств на поверхности титана путем деформационного наноструктурирования с последующей бомбардировкой высокофлуенсными ионами Ag^+ сотрудниками Института проблем сверхпластичности металлов Российской академии наук была сформирована однородная морфология наношипов на поверхности титана (рисунок 16).

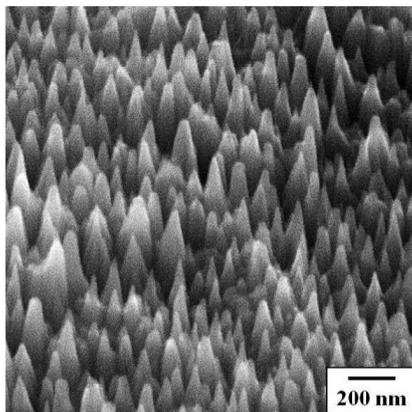


Рисунок 16 – Поверхность наноструктурированного титана с интенсивностью облучения Ag^+ с энергией 30 кэВ. Вторичная электронная микроскопия. Угол наклона 45° (Mulyukov et al., 2023)

Мы анализировали влияние структурирования поверхности на антибактериальные свойства материала. Было выявлено, что модифицированная область образца значительно меньше абсорбирует бактерии (рисунок 17).

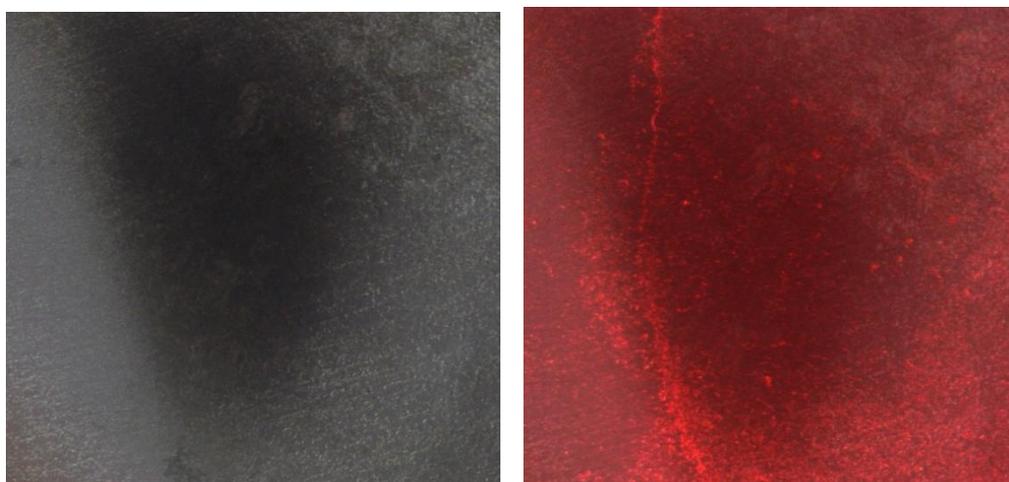


Рисунок 17 – Флуорисцентная микроскопия поверхности наноструктурированного Ti (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Учитывая тот факт, что антибактериальные свойства изучались на примере бактерий *E.coli*, были сформированы наношпицы высотой 200 нм и расстоянием между ними около 100 нм. Исследования с помощью флуоресцентной микроскопии показали, что при нанесении бактерий *E.coli* на гладкую поверхность титана бактерии образуют скопления клеток, аналогичные по структуре биопленке. В отличие от этого, на поверхности наношипов не наблюдаются скопления *E.coli*, то есть, обладает антибактериальными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать заключение, что с помощью модификации поверхности возможно добиться значительного уменьшения адгезии бактерий на поверхности различных материалов, используемых в медицине и предотвратить их зарастание микроорганизмами, что может существенно улучшить их качество.

Понимание механизмов адгезии бактерий к поверхности материалов имеет ключевое значение для разработки методов предотвращения инфекций и улучшения долговечности медицинских имплантов, оборудования и других изделий.

При разработке материалов для медицинских устройств ключевую роль играют гидрофобность и шероховатость поверхности. Оптимизация этих параметров позволяет минимизировать прикрепление бактерий, предотвращая развитие инфекций.

Одним из эффективных методов борьбы с бактериальной адгезией является использование антибактериальных покрытий. Такие покрытия создают защитный барьер, препятствующий размножению микроорганизмов на поверхности медицинского оборудования.

В будущем необходимо продолжить исследования для создания материалов с улучшенными антибактериальными свойствами. Особое внимание следует уделить разработке новых, более эффективных методов модификации поверхностей, направленных на предотвращение бактериальной адгезии.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что флуоресцентно меченные микроорганизмы являются удобным инструментом для выявления взаимодействия бактерий с различными материалами, в том числе и непрозрачными.
2. Показано, что изменение рельефа поверхности силикона методом литографии может значительно увеличить их антибактериальные свойства.
3. Модификации поверхности металла титана с образованием микрошипов приводит к уменьшению адсорбции на ней бактерий *E.coli*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова Е.М., Никандров Е.О., Юрченко Е.О. и др. Биотехнология: учебно-методическое пособие для лабораторно-практических занятий для студентов специальности 1-31 01 01 Биология. – Пинск: ПолесГУ, 2020. – 115с.
2. Галынкин В.А., Кочеровец В.И., Габидова А.Э. Фармацевтическая микробиология. – М.: Арнебия, 2015. –240с. (Источники и пути микробной контаминации в фармацевтическом производстве: В 2т.: 2-е изд., испр. / Под. ред. В.А. Галынкина; Т.2.).
3. Ковалева И.А., Котова А.О. Влияние диоксида титана на *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis* // *Universum: химия и биология* : электрон. научн. журн. – 2022. – №7. – С.97.
4. Криворучко, А.В. Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков: дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / Ившина Ирина Борисовна – Пермь, 2021. – 47с.
5. Литусов Н.В., Сергеев А.Г., Григорьева Ю.В. Патогенные грамотрицательные бактерии: учебное пособие. – Екатеринбург: Уральский ГМУ, 2023. – 56с.
6. Николаев, Ю.А. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма // *Микробиология*. – 2007. – Т.76. – №2. – С.149–163.
7. Серегина, Н.В. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2008. – Т.15. – №3. – С.175–177.
8. Сироткин, А.С. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы – Казань: Изд-во “Фэн” АН РТ, 2007. – 160с.
9. Alan W.D. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview // *Continental Shelf Research*. – 2000. – Vol.20. – P.1257–1273.

10. Avtokratova E.V., Sitdikov O.Sh., Zagitov R.R. et al. Effect of cryogenic rolling on structure and mechanical properties of ultrafine grained 157⁰C alloy // Letters on Materials. – 2023. – Vol.13. – No.4. – P.426–430.
11. Barshutinaa M., Yakubovskya D., Kirtaev R. Design of silicone interfaces with antibacterial properties // Biofouling. – 2023. – Vol.39. – No.5. – P.473–482.
12. Carniello V., Brandon W.P., Henny C. et al. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surfaceprogrammed biofilm growth // Advances in Colloid and Interface Science. – 2018. – Vol.261. – P.1–14.
13. Chun-Ju C., Shinn-Jyh D., Chun-Cheng C. Effects of Surface Conditions of Titanium Dental Implants on Bacterial Adhesion // Photomed Laser Surg. – 2016. – Vol.34. – No.9. – P.379.
14. Dayan A., Babin G., Ganoth A. et al. The involvement of coordinative interactions in the binding of dihydrolipoamide dehydrogenase to titanium dioxide – Localization of a putative binding site // Journal of Molecular Recognition. – 2017. – Vol.30. – No.8. – P.11.
15. Hassan A.K., Fatima K.B., Riffat M. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2017. – Vol.7. – No.5.
16. Hongyan HE, Pengyang GAO, Zhongqian QIAO et al. Study on antibacterial properties of titanium metallic surface due to synergistic action of micro/nano-structure and antimicrobial peptides // Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, Sept. – 2018. – Vol.32. – No.9.
17. Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C.D., Pereira G.A. Cell surface components and adhesion in Corynebacterium // Microbes and Infection. – 2000. – Vol.2. – P.1507–1512.
18. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D. et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime // Nat Methods. – 2007. – Vol.4. – No.7. – P.555.

19. Moissl C., Rudolph C., Rachel R. et al. In situ growth of the novel SM1 euryarchaeon from a string-of-pearls-like microbial community in its cold biotope, its physical separation and insights into its structure and physiology // *Archives in Microbiology*. – 2003. – Vol.180. – No.3. – P. 211–217.
20. Mulyukov R.R., Khisamov R.K., Borisov A.M. et al. Antibacterial nanospike surface obtained by high-fluence Ar⁺ bombardment of nanostructured titanium // *Letters on Materials*. – 2023. – Vol.13. – No.4. – P.373-376.
21. Ofek I., Bayer E.A., Abraham S.N. Bacterial adhesion // *The Prokaryotes: Human Microbiology*. – 2013. – Vol.25. – P.107–123.
22. Yoshiki O., Nobuhiro A., Noriyuki H. et al. Verification of Implant Surface Modification by a Novel Processing Method // *Acta Med. Okayama*. – 2017. – Vol.71. – No.1. – P.49–57.
23. Yuehuei H.A., Richard J.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2002. – Vol.43. – P.338–348.

СПРАВКА

Башкирский государственный медицинский университет

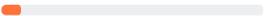
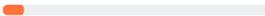
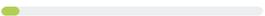
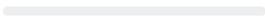
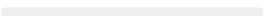
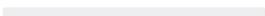
о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Горобец К. С.
Самоцитирование
рассчитано для: Горобец К. С.
Название работы: ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ МАТЕРИАЛОВ НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI XL-BLUE
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: Башкирский Государственный Медицинский Университет

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

СОВПАДЕНИЯ		8.2%	СОВПАДЕНИЯ		7.61%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		84.92%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		92.39%
ЦИТИРОВАНИЯ		6.88%	ЦИТИРОВАНИЯ		0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 18.06.2024

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 20.06.2024 09:03

Структура документа: Проверенные разделы: библиография с.49-51, титульный лист с.1, содержание с.2, основная часть с.3-48

Модули поиска: Переводные заимствования*; ИПС Адилет; Коллекция НБУ; Шаблонные фразы; Цитирование; IEEE; Библиография; Переводные заимствования по Интернету (EnRu); СПС ГАРАНТ: аналитика; Диссертации НББ; Кольцо вузов; Перефразирования по коллекции IEEE; Публикации eLIBRARY; СМИ России и СНГ; Издательство Wiley; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Перефразирования по Интернету (EN); Патенты СССР, РФ, СНГ; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Переводные заимствования IEEE; Переводные заимствования (RuEn); Медицина; Интернет Плюс*; Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Перефразированные

Работу проверил: Банникова Ольга Сергеевна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего



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

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