

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



Мажитова Аделия Ильдаровна

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ МАТЕРИАЛОВ НА
АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*

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>Rhizobium leguminosarum</i>	8
1.3 Строение клетки и клеточной стенки у <i>R. leguminosarum</i>	10
1.3.1 Липополисахариды клеточной поверхности	11
1.3.2 Экзополисахариды клеточной поверхности	12
1.4 Формирование биопленок бактериями <i>R. leguminosarum</i>	14
1.5 Влияние структуры поверхности для возможности прикрепления бактерий <i>R. leguminosarum</i>	18
1.6 Проблема зарастания материалов, используемых в медицинской практике	20
1.7 Различные способы маркировки клеток бактерий	22
1.8 Микроскопирование в микробиологии	26
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1 Культивирование бактерий на питательной среде	34
2.2 Обработка материалов культурой бактерий	36
2.3 Микроскопический анализ	37
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	49

Список сокращений и условных обозначений

АСМ – Атомно-силовая микроскопия

КПС (CPS) – капсульный полисахарид

ЛПС (LPS) – липополисахарид

ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

ЭПС (EPS) – экзополисахарид

FCS – флуоресцентная корреляционная спектроскопия

FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

GFP – зеленый флуоресцентный белок

Rap – *Rhizobium* adhering protein

RFP – красный флуоресцентный белок

TurboRFP – ген красного флуоресцентного белка

YM-среда – маннитно-дрожжевая среда

ВВЕДЕНИЕ

Понимание взаимодействия бактерий с поверхностью материалов открывает новые возможности для разработки антимикробных покрытий и устройств, препятствующих колонизации микроорганизмов на медицинском оборудовании и имплантатах. Для данного исследования использованы титановые и пластиковые образцы с различными модификациями поверхности.

Титан – это металл, отличающийся высокой коррозионной стойкостью, биосовместимостью и прочностью. Это делает его идеальным материалом для использования в хирургии, стоматологии, нейрохирургии и других медицинских областях.

Пластик обладает рядом преимуществ, таких как легкость, гибкость, прочность, устойчивость к химическим веществам, а также простота очистки и дезинфекции.

Rhizobium leguminosarum – это граммотрицательные, почвенные бактерии, обладающие способностью образовывать симбиотические отношения с растениями бобовых. Прикрепление *R. leguminosarum* к корням бобовых происходит за счет комплексного механизма, включающего как специфические белки на поверхности бактерии, называемые адгезинами, так и поверхностные полисахариды. Адгезины взаимодействуют с рецепторами на корневых клетках, обеспечивая прочное прикрепление бактерий к поверхности корня.

Бактерии могут прикрепляться как к биотическим, так и к абиотическим поверхностям, образуя на них такие сложные структуры, как биопленки.

Заращение материалов бактериями может привести к различным проблемам. Например, это может способствовать развитию инфекции, особенно в случае использования имплантатов или протезов, что является серьезной угрозой для безопасности здоровья человека.

Цель дипломной работы. Провести анализ влияния модификации поверхности материалов на степень адгезии диких штаммов грамотрицательных бактерий *Rhizobium leguminosarum*, имеющих значительное количество липополисахаридов и экзополисахаридов на своей поверхности.

Объект исследования. Модифицированные поверхности титана и пластика.

Предмет исследования. Изучение воздействия модифицированной поверхности титана и пластика на способность к адгезии бактерий *Rhizobium leguminosarum*.

Задачи:

1. Нарботать культуры штаммов *R. leguminosarum* ГЛЗ, маркированных красными флуоресцентными белками.
2. Провести обработку бактериями образцов титановых и пластиковых материалов с модифицированной поверхностью и без.
3. Провести микроскопический анализ степени адгезии бактерий на поверхности исследуемых образцов.

Практическая значимость. Получение материалов с антибактериальными поверхностями даст возможность создавать медицинское оборудование, инструменты, протезы, импланты и т.д. стойкие к зарастанию бактериями, что позволить более безопасно их использовать в медицинских целях.

Область применения. Медицина, микробиологическая биотехнология.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность

В настоящее время титан и пластик являются одними из наиболее распространенных материалов, используемых в различных медицинских областях. Титан легкий и долговечный, что делает его удобным для создания различных медицинских инструментов, протезов, имплантатов и оборудования. Пластик – это материал, применяемый для изготовления медицинских инструментов, расходных материалов, контейнеров для хранения и транспортировки лекарств. Он достаточно легкий, гибок и имеет доступную цену. Его легко стерилизовать и мыть, но из-за того, что он менее прочем, чем металлы, он может легко повредиться или износиться.

При использовании катетеров, имплантов и других изделий медицинского назначения, может возникнуть проблема их контаминации и зарастания микроорганизмами. Это, в свою очередь, может привести к серьезным инфекционным осложнениям у пациента [32].

Согласно литературе, модификация поверхности титана и нанесение покрытий стали активно изучаться в последние годы с целью снижения риска бактериального инфицирования имплантированных материалов. Исследования демонстрируют, что эти методы позволяют минимизировать адгезию бактерий, препятствовать формированию биопленок и эффективно уничтожать патогенные микроорганизмы, тем самым обеспечивая надежную защиту имплантатов [18].

В данном исследовании мы изучаем адгезию природных бактерий *Rhizobium leguminosarum* на модифицированных поверхностях титана и пластика. Адгезия – это процесс прочного прикрепления бактерий к поверхности твердого субстрата или другой клетки. Изучение данного процесса позволит нам лучше понять взаимодействие между бактериями и их окружающей средой.

Прикрепление к субстрату бактерий *R. leguminosarum* возможно за счет белковых компонентов – адгезинов и белковых соединений, которые могут связываться с углеводами – лектинами. Помимо этого, у бактерии имеется углеводная капсула – слизь, продуцируемая бактерией, которая в свою очередь обволакивает бактерию и способствует прикреплению к субстрату. Было высказано предположение, что и кальций в конечном итоге влияет на свойства клеточной адгезии [20].

Проводились исследования, целью которых была количественная оценка адгезии биопленки и жизнеспособности бактериальных клеток на различных типах титановых поверхностей, сочетающих разный уровень шероховатости и антибактериальные покрытия [43].

Созданные бактериями на поверхности материалов биопленки представляют собой сложные сообщества микроорганизмов, окруженные внеклеточным матриксом, который обеспечивает им защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды, антибиотиков и иммунной системы организма.

Известно, что на формирование биопленки влияет не только материал поверхности, но и её микроструктура [10]. В зависимости от структуры поверхности можно добиться увеличения устойчивости к адгезии бактерий, благодаря чему возможно создание новых безопасных изделий с антибактериальными свойствами. В результате этого будет предотвращено образование биопленки, что поможет избежать заражения поверхности бактериями.

Таким образом, исследования по влиянию модификации поверхности титана и пластика на адгезию бактерий *R. leguminosarum* имеют широкие перспективы для применения в медицине и могут способствовать развитию новых технологий и методов борьбы с инфекционными заболеваниями.

1.2 Бактерии *Rhizobium leguminosarum*

Бактерии рода *Rhizobium* принадлежат к типу Протеобактерий (*Proteobacteria*), классу Альфа-протеобактерии (*Alphaproteobacteria*), порядку Ризобииальные (*Rhizobiales*) и семейству Ризобиевые (*Rhizobiaceae*) [15].

Бактерии *R. leguminosarum* представляют собой грамотрицательные, аэробные микроорганизмы, не образующие спор, но обладающие уникальной способностью фиксировать атмосферный азот. Этот процесс происходит при образовании симбиотических связей с корнями определённых видов бобовых растений, таких как горох (*Pisum*), клевер (*Trifolium*), фасоль (*Phaseolus*) и другие. Это специфичное для растения-хозяина взаимодействие приводит к развитию корневых клубеньков, в которых бактерии *Rhizobium* дифференцируются в азотфиксирующие бактериоиды [30]. Клетки зрелых клубеньков бобовых содержат по несколько тысяч бактериоидов.

Прикрепление к растительным клеткам – это комплексное взаимодействие, которое включает в себя множество факторов [33]. Для корневых волосков выделяют два основных этапа. На первом этапе происходит первичное связывание, опосредованное бактериальными адгезинами или лектинами растительного происхождения [39]. Вторичный этап прикрепления может включать закрепление фибриллами бактериальной целлюлозы. Этот этап способствует инфицированию быстрорастущих корневых волосков [31]. Инфицирование корней клубеньковыми бактериями может происходить различными способами, которые варьируются от самого простого – через разрывы эпидермиса до наиболее сложного – формирования инфекционных нитей. Некоторые ризобии имеют способность к инфицированию тканей хозяина без включения азотфиксации. Некоторые факторы окружающей среды

способствуют образованию клубеньков, тогда как другие вызывают стресс [17].

Ризобии преимущественно встречаются в свободноживущем состоянии, населяя почву, ризосферу или непосредственно поверхность корней [44].

Данные бактерии имеют большое значение для плодородия почвы, поскольку они способны образовывать на корнях растений клубеньки, внутри которых происходит преобразование атмосферного азота в аммиак, усваиваемый в дальнейшем растениями. Восстановление молекулярного азота в аммоний катализируется нитрогеназным ферментным комплексом, который синтезируют ризобии. На поддержание симбиотической азотфиксации растение должно расходовать 10-20% продуктов фотосинтеза.

Ризобии способны годами сохраняться в почвенной среде между фазами симбиоза. Известно, что ризобии продуцируют избыточное количество поверхностных экзополисахаридов в качестве одного из их основных механизмов адаптации к иссушению и другим абиотическим стрессам [26].

Была озвучена гипотеза, что образ жизни в биопленке представляет собой наиболее эффективный метод сохранения ризобий и увеличения вероятности формирования клубеньков [44].

Для бактерий рода *Rhizobium* ключевым аспектом успешной колонизации растения-хозяина является выделение полисахаридной слизи. Этот процесс играет важную роль в прикреплении бактериальной клетки к корневому волоску, а также стимулирует в клетке корня формирование нитей нодуляции [7].

В лабораторных условиях селективной средой для роста бактерий рода *Rhizobium* является бобовый агар. Оптимальная температура для роста ризобий – около 24-27 °С. Бактерии образуют выпуклые колонии кремового цвета, с глянцевой поверхностью и обильным количеством слизи.

Отличительной особенностью ризобий является их способность расти на манните в виде единственного источника углерода [7].

1.3 Строение клетки и клеточной стенки у *R. leguminosarum*

Rhizobium leguminosarum представляет собой небольшую, палочковидной формы клетку. Внутри клетки находится цитоплазма, включая генетический аппарат, рибосомы и другие структуры. ДНК бактерии находится в виде кольцевой молекулы, называемой плазмидой. Геном состоит из кольцевой хромосомы и шести кольцевых плазмид [48]. Плазида содержит гены, отвечающие за формирование азотфиксирующих клубеньков, а также за синтез ферментов, необходимых для фиксации азота. К ним относятся гены *nod*, которые кодируют биосинтез факторов Nod – сигнальных молекул ризобий, вызывающих образование клубеньков на корнях.

Оболочка бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* имеет сложную многокомпонентную структуру, являясь важным защитным барьером, предотвращающим проникновение вредных веществ в клетку. В процессе изменений условий окружающей среды клетка должна поддерживать функцию оболочки, чтобы обеспечить избирательный проход питательных веществ в клетку и продуктов жизнедеятельности из клетки. Состоит оболочка из трех слоев: цитоплазматической мембраны (ЦПМ), клеточной стенки и защитной слизистой капсулы.

ЦПМ – тонкая, полупроницаемая мембрана, отделяющая цитоплазму от внешней среды. Она контролирует движение веществ в клетку и из нее, участвует в транспорте питательных веществ и выведении продуктов метаболизма.

Клеточная стенка, как и у всех грамотрицательных бактерий, состоит из двух основных слоев:

1. Пептидогликановый слой – тонкий слой пептидогликана, обеспечивающий прочность и жесткость, а также форму клетки.
2. Внешняя мембрана – состоит из липополисахаридов, фосфолипидов и белков.

В клеточной стенке накапливается кальций, необходимый для нормального роста клетки ризобии. Дефицит Ca^{2+} может привести к изменению формы клеток, снижает их прочность и меняет антигенные свойства.

Защитная слизистая капсула – внешняя оболочка, состоящая из множества полисахаридов, таких как липополисахариды, экзополисахариды, кислые капсульные полисахариды.

1.3.1 Липополисахариды клеточной поверхности

Поверхность ризобияльных клеток содержит множество полисахаридов, например, липополисахариды (LPS), капсульные полисахариды (CPS), гелеобразующие полисахариды (GPS), экзополисахариды (EPS) и др. [30, 16, 38, 26].

Наружный слой внешней мембраны грамотрицательных бактерий построен из липополисахарида (LPS), который у ризобий, как и у других бактерий, является ключевым фактором, определяющим антигенность поверхности бактериальных клеток.

LPS являются сложными молекулами, состоящими из трех основных частей:

1. Липид А – жирная кислота, закрепленная в клеточной мембране. Она является наиболее консервативной частью ЛПС и отвечает за иммуностимулирующую активность.
2. Ядровый полисахарид: короткий олигосахарид, специфичный для каждого вида бактерий.

3. О-антиген – полисахаридный полимер, который может варьироваться по структуре и составу. Он является наиболее изменчивой частью ЛПС и отвечает за антигенные свойства бактерий.

ЛПС, экспрессирующийся у бактерий в клубеньках, более гидрофобен, чем ЛПС бактерий в чистой культуре. Такие различия могут быть связаны с углеводной частью молекулы, а также с различным содержанием жирных кислот с длинной цепью.

Липидная структура ризобиальных LPS отличается от структуры кишечных бактерий тем, что в ней отсутствуют фосфатные группы и она ацилирована гидроксилированными жирными кислотами различной длины, одной из которых является необычная жирная кислота с очень длинной цепью, 27-гидроксиоктакозановая [5].

Центральный олигосахарид *R. leguminosarum* состоит из октасахарида маннозы (Man), галактозы (Gal), галактуроновой кислоты (GalA) и остатков 3-дезоксид-манно-2-октулозоновой кислоты (Kdo). В бактериях рода *Rhizobium* предпочтение отдается нейтральным полисахаридам О-антигена, обладают относительно гидрофобными свойствами [36].

Было проведено множество исследований, посвященных влиянию липополисахаридов на образование биопленок. Например, центральная область О-антигена ЛПС *R. leguminosarum* необходима для образования компактной структуры биопленки. А также, что внешняя часть ЛПС влияет на адгезионные свойства как на абиотической поверхности, так и на поверхности корней растений, что обусловлено химическими свойствами ЛПС [5].

1.3.2 Экзополисахариды клеточной поверхности

Экзополисахариды (EPS) – это полисахариды, которые выделяются бактериями во внешнюю среду. Они либо состоят из одинаковых остатков сахара (гомополимеры), либо из нескольких разных остатков

(гетерополимеры). EPS ризобий представляют собой моносахариды, такие как D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, D-глюкуроновая кислота и D-галактурановая кислота,

Основным экзополисахаридом, вырабатываемым *R. leguminosarum*, является кислотный EPS, который образуется в результате полимеризации повторяющейся единицы, состоящей из пяти остатков глюкозы, двух остатков глюкуроновой кислоты и галактозы [5]. Кислые EPS, выделяемые в больших количествах ризобиями, представляют собой видоспецифичные соединения, состоящие из обычных сахаров, замещенных неуглеводными остатками.

Биосинтез ЭПС в *R. leguminosarum* – многоступенчатый процесс, требующий экспрессии нескольких генов *pss*, расположенных в главном кластере EPS на хромосоме [27]. Регуляция синтеза ЭПС происходит на разных уровнях генной экспрессии.

В хромосоме ризобии расположен кластер генов Pss-I, который содержит более 20 генов, отвечающих за синтез EPS [23, 29, 48]. Этот кластер включает гены, кодирующие белки, участвующие в синтезе субъединиц EPS, за исключением гена *pssA*. Кроме того, в кластере Pss-I находятся гены, продукты которых участвуют в сборке и транспорте ЭПС [4].

У *R. leguminosarum* система секреции PrsD-prsE I типа секретирует два близкородственных фермента – гликаназа PlyA и гликаназа PlyB, которые в свою очередь, расщепляют кислотный ЭПС [27]. И PlyB, и PlyA могут расщеплять зрелые кислые ЭПС, но, вероятно, для их активации требуется синтез зарождающихся ЭПС. Считается, что такая регуляция их активности ограничивает расщепление кислых ЭПС областью, прилегающей к поверхности бактерий [50].

Предположительно, белки, секретируемые через систему секреции *PrsD-prsE* типа I, связаны с различными аспектами переработки ЭПС и формирования биопленки, и показывает, что кислотный ЭПС необходим

для образования биопленки как на абиотических поверхностях, так и на корнях растений-хозяев, являясь основным компонентом матрицы биопленки [27, 21, 35].

1.4 Формирование биопленок бактериями *R. leguminosarum*

Биопленки – бактериальные популяции, которые образуются на поверхности различных материалов или субстратов. Эти сообщества бактерий окружены самопроизвольно синтезированной полимерной матрицей, которая обеспечивает им структурную целостность и защиту. Биопленка представляет собой трехмерную структуру, которая образуется благодаря взаимодействию микроорганизмов с поверхностью. Этот процесс начинается с начальной адгезии к поверхностям, за которой следует колонизация и образование внеклеточного полисахаридного матрикса (EPS) [49].

Адгезия происходит благодаря специальным структурам на поверхности бактерий. Множественные факторы, включая состав субстрата, наличие питательных веществ и условия окружающей среды, могут влиять на способность бактерий присоединяться к различным поверхностям. После того, как бактерии прикрепилась к поверхности, они начинают размножаться и образовывать слой. В процессе этого формируется внеклеточный матрикс, который обеспечивает защиту бактерий от внешних воздействий, таких как антибиотики, иммунная система организма или химические вещества.

Широко признано, что многие виды бактерий живут преимущественно в биопленках, а не ведут планктонный образ жизни как в естественной, так и в искусственной среде [19, 45]. Для большинства бактерий биопленки служат как физический барьер, который защищает клетки от воздействия неблагоприятных условий окружающей среды и токсичных соединений [3].

Образование биопленок является важным фактором, определяющим конкурентоспособность ризобийных клеток на частицах почвы и корнях растений [3].

Можно выделить различные этапы формирования биопленки:

1. Первоначальное прикрепление к поверхности – происходит благодаря специфическим взаимодействиям между клеткой бактерии и поверхностью. Этот процесс обеспечивается за счет поверхностных структур микроорганизма – адгезинов.
2. Образование микроколоний – небольших скоплений бактериальных клеток, которые начинают взаимодействовать друг с другом. Между клетками происходит обмен сигналами, что способствует координации роста и развития биопленки.
3. Созревание представляет собой развитие клеток, образование более сложных структур. Биопленка достигает полной зрелости и становится трехмерной структурой с каналами для прохождения питательных веществ и удаления отходов.
4. Диспергирование и гибель клеток – последний этап жизненного цикла, когда клетки покидают микроколонии и могут переходить в другие формы жизни или погибать.

Процесс инфекции, ведущий к образованию клубеньков, начинается с контакта бактерий *R. leguminosarum* с корнями растения-хозяина. Современные исследования показывают, что этот контакт начинается с неспецифической адгезии, при которой бактерии прикрепляются к корням с помощью своих поверхностных компонентов [11].

Первый этап адгезии характеризуется слабым и обратимым присоединением. В этом процессе участвуют синтезируемые бактерией поверхностные полисахариды, такие как экзополисахарид, липополисахарид, капсулярные полисахариды, лектины растений и бактериальные адгезины, включая белки, способные связывать Ca^{2+} . На этом этапе также начинается формирование микробной биопленки на

корнях растений. Второй этап адгезии более прочный и необратимый за счет выделения бактериальных целлюлозных фибрилл [11]. Завершается данный этап адгезии формированием зрелых бактериальных микроколоний.

Поверхностные полисахариды ризобий функционируют как адгезины, являясь лигандами сахаро-связывающих белков (лектинов), находящихся на поверхности корней [4].

Было показано, что отсутствие или избыток внеклеточного мономерного кальций-связывающего лектина CPS (белок RapA2) изменяет свойства матрицы биопленки. Взаимодействие RapA2, состоящего из двух CHDL, с кислыми экзополисахаридами влияет на адгезию бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и сборку матрицы биопленки [13, 40].

В микроколониях биопленки, разработанной бактериями *Rhizobium leguminosarum*, ризобиальные клетки тесно взаимодействуют через латеральные и полярные связи, образуя организованные и компактные клеточные агрегаты. Эти микроколонии встроены в матрицу биопленки, основным компонентом которой является кислотный экзополисахарид (EPS).

В одном из исследований был изолирован мутант *R. leguminosarum* bv. *viciae*, обладающий повышенной чувствительностью к обезвоживанию. Данный штамм показал низкий уровень накопления ЭПС, а также образовывал дефектные биопленки на микропланшетах из полистирола. Эти данные доказывают ключевую роль ЭПС в устойчивости к обезвоживанию у ризобий и подтверждают его участие в процессах формирования биопленок в условиях стресса [5].

Область ядра О-цепи липополисахарида (LPS) *R. leguminosarum* (который простирается от поверхности клетки) сильно влияет на адгезивные свойства бактерий и межклеточное сцепление. У мутантов с дефектом О-цепи или фрагмента ядра О-цепи развились преждевременные микроколонии, в которых латеральные контакты бактерий были значительно снижены. Межклеточные взаимодействия

внутри микроколоний мутантов ЛПС опосредовались в основном через их полюса, что привело к образованию биопленки с измененной трехмерной структурой и увеличенной толщиной. Кроме того, на эпидермисе корней и на корневых волосках штаммы, дефектные по O-антигенному ядру, демонстрировали измененный рисунок биопленки с нарушением типичного уплотнения микроколоний. В совокупности эти результаты указывают на то, что поверхностная часть ЛПС имеет решающее значение для надлежащего межклеточного взаимодействия и формирования прочных биопленок на различных поверхностях.

В ходе работы по секреции PlyA и PlyB наблюдали, что мутанты секреции *prsD* и *prsE* *R. leguminosarum* bv. *viciae* последовательно продуцировали значительно уменьшенные кольца биопленки по сравнению с диким типом на границе раздела жидкость-воздух при встряхивании культур в колбах, что позволяет предположить роль белков, секретируемых *PrsD-prsE*, в образовании биопленки [37].

Мутанты *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамма А34, дефектного в производстве кислого EPS и капсульного полисахарида (CPS), не смогли развить типичные микроколонии и структурированную биопленку *in vitro* [37]. Было предложено, что две EPS- β -1,4 гликаназы и несколько белков из семейства Rap, секретируемые системой PrsDE, участвуют в созревании организованной структуры биопленки [28]. Один из белков Rap, RapA2, представляет собой кальций-зависимый лектин, который специфически взаимодействует с EPS и CPS *R. leguminosarum*, поддерживая роль Rap в формировании матрицы биопленки. Таким образом, взаимодействие RapA-лектинов с полисахаридом участвует в сборке и ремоделировании матрицы биопленки ризобий [44].

Недавно у мутанта с дефектом в репрессоре транскрипции PrAr наблюдалась сверхэкспрессия нескольких Rap, что привело к усилению прикрепления корня и конкурентоспособности. Кроме того, у штамма 3841 *R. leguminosarum* bv. *viciae* высокий уровень белков Rap, включая

RapA2, способствует прикреплению ризобий к корням гороха и дает конкурентное преимущество при образовании клубеньков [22].

Для создания биопленки *in vitro* секвенированным штаммом 3841 требуется ЭПС, но не целлюлоза, глюкоманнан или гелеобразующий полисахарид, тогда как глюкоманнан и целлюлоза требовались для формирования биопленки на корневых волосках [36]. Кроме того, кальций, по-видимому, играет важную роль в адгезии *R. leguminosarum*, до гидрофильных абиотических поверхностей путем ремоделирования структур полисахаридов более высокого порядка. Было высказано предположение, что кальций влияет на шероховатость поверхности и гидрофильный характер, что в конечном итоге влияет на свойства клеточной адгезии [20].

Для ризобий формирование биопленок является стратегией выживания в условиях ограниченного питания, поскольку подобная организация клеток обеспечивает ряд преимуществ, таких как, например, повышение концентрации необходимых для роста питательных веществ, которые могут поглощаться поверхностью биопленки [3].

Важной особенностью биопленки является ее способность образовываться как на биотических, так и на абиотических поверхностях. Это, в свою очередь, тесно связано с разнообразным спектром промышленных наростов биопленки, а также с проблемами здоровья человека, такими как кариес зубов, инфекционный эндокардит, муковисцидозная пневмония и инфицирование катетеров для перитонеального диализа [49].

1.5 Влияние структуры поверхности для возможности прикрепления бактерий *R. leguminosarum*

Биосовместимость имплантата напрямую зависит от свойств его поверхности. Химический состав, фазовый состав, шероховатость,

топография, поверхностная энергия и антибактериальные свойства поверхности влияют на взаимодействие имплантата с тканями организма, определяя скорость и характер приживления, а также риск отторжения или инфицирования [42].

Бактерии могут прикрепляться к различным поверхностям, включая металлы и пластик, и влияние структуры поверхности может существенно влиять на способность бактерий к адгезии и росту.

Особенности, такие как текстура и химический состав, могут способствовать росту бактерий. Например, микроструктуры и наночастицы обеспечивают большую поверхность для прикрепления. Физико-химические свойства, такие как поверхностный потенциал, пористость, шероховатость, гидрофильность и гидрофобность, также оказывают влияние на адсорбцию бактерий [24, 25, 41].

Гидрофильные поверхности, такие как металл и стекло, притягивают воду и, следовательно, легко смачиваются водой. Это делает их более подверженными бактериальному росту, так как вода является необходимой средой для существования многих бактерий. В то же время гидрофобные поверхности, такие как пластик, отталкивают воду, что может снизить вероятность прикрепления некоторых бактерий. Именно такие поверхности привлекают бактерии *R. leguminosarum*. Это связано с тем, что бактерии также имеют гидрофобную поверхность и, таким образом, устанавливают гидрофобные взаимодействия с поверхностью. Существуют также поверхности с «амфифильными» свойствами, которые могут иметь как гидрофильные, так и гидрофобные области, что может влиять на прикрепление бактерий в зависимости от их свойств.

Электростатическая сила может влиять на прикрепление бактерий к поверхности в случае, если бактерии и поверхность имеют разные электрические заряды. Если бактерии и поверхность имеют противоположные электрические заряды, то электростатическая сила притяжения может способствовать прикреплению бактерий к поверхности.

Некоторые исследования показали, что адгезия бактерий к поверхности с положительным зета-потенциалом усиливается, но последующее образование биопленки замедляется, что указывает на отрицательное воздействие положительно заряженной поверхности на процесс формирования биопленки [24].

Согласно литературе, по мере увеличения шероховатости поверхности также увеличивается адгезия бактерий и образование биопленки [46, 47]. Высокая шероховатость не только обеспечивает большую площадь поверхности для адгезии бактерий и дополнительных ниш, но также снижает силы сдвига и, следовательно, помогает бактериям освободиться от защитных механизмов хозяина на начальной стадии адгезии [14]. Поэтому важно оптимизировать структуру поверхности для контроля роста бактерий. Это можно достичь путем использования специальных покрытий, обработки поверхности или выбора материалов с определенными характеристиками.

Для предотвращения роста бактерий также могут быть использованы антибактериальные вещества или технологии, которые создают неблагоприятные условия для их размножения.

1.6 Проблема зарастания материалов, используемых в медицинской практике

В современной литературе большое внимание уделяется борьбе с биопленкообразованием как на биотических, так и на абиотических поверхностях, в том числе вне человеческого организма [10].

В медицинской практике используется достаточно большой спектр материалов, от металлов и керамики до синтетических и натуральных полимеров.

Титан представляет собой прочный и легкий металл, который широко используется в медицинской промышленности из-за его биологической

совместимости с человеческим организмом. Он не вызывает аллергических реакций и имеет высокую коррозионную стойкость. Однако, данный материал имеет и минусы, такие как: высокая стоимость и требование специального оборудования для его обработки.

Пластик – это легкий, гибкий и более доступный по цене материал, который также часто используется в медицинской практике. Пластик легко стерилизуется и может быть легко очищен, однако он менее прочен, чем металлы, и может легко повредиться или износиться.

При использовании катетеров, имплантатов и других медицинских изделий может возникнуть проблема их заражения микроорганизмами и образования инфекции, что может привести к боли в ранах, инфекции и серьезным осложнениям для пациента. Для предотвращения этой проблемы необходимо соблюдать правила асептики, санитарии и гигиены при обращении с медицинскими изделиями. Необходимо правильно и своевременно дезинфицировать и стерилизовать инструменты и следить за их состоянием.

Используют различные методы стерилизации и дезинфекции: автоклавирование, обработка ультрафиолетовым излучением, применение антисептических средств и другое.

Стерилизация – это уничтожение всех микроорганизмов, включая как вегетативные, так и споровые формы. К стерилизации относятся в основном физические методы: прокалывание на огне, кипячение, стерилизация сухим жаром, стерилизация паром, обработка ультрафиолетовым облучением [9].

Автоклавирование является одним из самых распространенных методов стерилизации в бактериологической практике, при котором используется автоклав – специальное устройство, которое создает высокое давление и температуру для уничтожения практически всех микроорганизмов.

Стерилизация ультрафиолетовым излучением эффективна не только для обработки воздуха в помещениях, но и для обработки медицинских

изделий. Для этого обычно используют специальные ультрафиолетовые лампы или камеры, которые обеспечивают оптимальное излучение для уничтожения микроорганизмов.

Химическая обработка включает применение специальных растворов или газов для дезинфекции инструментов. Примеры химических стерилизантаов включают перекись водорода, формалин, этиленоксид и другие вещества.

Кроме вышеперечисленного, обработка специальными соединениями формируют на обработанной поверхности бактерицидную пленку, которая препятствует адгезии бактерий [10].

Выбор метода стерилизации зависит от нескольких факторов, включая тип инструмента, его материала, структуры, а также требования к стерильности. При необходимости применяют комплексный подход стерилизации для обеспечения максимальной безопасности применения материала.

1.7 Различные способы маркировки клеток бактерий

Одним из способов маркировки клеток является применение окраски по Граму, которое позволяет идентифицировать бактериальные клетки в зависимости от химического состава клеточной оболочки. Данный метод позволяет разделить бактерии на две основные группы: грамположительные и грамотрицательные.

Этапы окраски по Граму:

1. Делают мазок бактерий на подготовленном предметном стекле и высушивают на воздухе. Фиксируют мазок над пламенем горелки.
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 течении 30 сек. и просушивают.
6. Окрашивают дополнительным красителем (например, фуксин) 15 сек., промывают, высушивают и делают микроскопию мазка.

Грамположительные бактерии удерживают краситель и окрашиваются в фиолетовый цвет, так как содержат в клеточной стенке большое количество пептидогликана (40-90%), а грамотрицательные бактерии, так как имеют тонкий слой пептидогликана, не удерживают краситель и окрашиваются в красный или розовый цвет [9].

Флуоресцентная маркировка бактерий – это метод, который используется для визуализации и идентификации бактерий с помощью флуоресцентных меток. Этот метод основан на использовании специальных флуорофоров, которые прикрепляются к молекулам внутри бактерий и светятся при облучении ультрафиолетовым светом. Для наблюдения маркированных бактерий используется флуоресцентный микроскоп с определенной длиной волны. Наиболее удобными в использовании метками являются белки, которые могут легко проникнуть в объект.

Флуоресцентная маркировка бактерий состоит из следующих этапов:

1. Выращивание культуры бактерий на питательной среде до нужной концентрации.
2. Приготовление маркирующего реагента.
3. Маркировка бактерий – культура бактерий обрабатывается маркирующим реагентом, который проникает в клетки и привязывается к определенным молекулам внутри клеток.
4. Фиксация маркированных бактерий – после маркировки бактерии фиксируются, чтобы сохранить структуру клеток и избежать потери сигнала флуорофора.
5. Обработка образца, например, путем окрашивания ядер или структур клеток.

6. Микроскопия и анализ результатов.

Преимущества такой маркировки включают возможность наблюдения за живыми бактериями в реальном времени, высокую чувствительность и точность идентификации видов бактерий. Этот метод используется в микробиологии, медицине, научных исследованиях и других областях, где необходимо изучать структуру и функции бактерий.

Минусы метода флуоресцентной маркировки бактерий:

1. Некоторые флуорофоровые метки могут демонстрировать ограниченную стойкость к воздействию определенных условий, таких как факторы окружающей среды и длительность экспозиции.
2. Для использования данного метода требуются специализированные реагенты и оборудование, такое как микроскоп с возможностью флуоресцентной детекции.
3. Возможность воздействия на клетки – использование флуорофоров может повлиять на состояние и поведение маркированных бактерий, что может исказить результаты исследования.

Иммунофлуоресцентная маркировка бактерий – это метод, который позволяет обнаруживать и идентифицировать бактерии с использованием специфических антител, размеченных флуорохромами. Этот метод основан на способности антител связываться с антигенами на поверхности бактерий и светиться под воздействием света определенных длин волн.

Процесс может выглядеть следующим образом:

1. Сначала берут образец с бактериями и фиксируют его на предметном стекле.
2. Затем добавляют антитела, специфичные к выбранному антигену на бактерии. Антитела будут связываться с антигенами на поверхности бактерий.
3. Образец промывают, чтобы удалить несвязанные антитела.
4. После этого проводится стадия флуоресцентной маркировки, когда добавляют флуорохромные метки, которые привяжутся к антителам.

5. После промывки несвязанных меток оставшиеся светящиеся флуорохромы будут видны под флуоресцентным микроскопом, что позволит увидеть и идентифицировать бактерии. Бактерии будут светиться флуоресцентным цветом, соответствующим используемому красителю.

Преимущества данного метода включают в себя высокую специфичность и чувствительность – метод позволяет точно идентифицировать бактерии на уровне отдельных клеток, а также возможность одновременного определения нескольких видов бактерии.

Недостатками метода является необходимость наличия специфических антител для конкретных видов бактерий и возможность неспецифического связывания антител.

В настоящее время наиболее удобными и эффективными прижизненными маркерами считаются гены флуоресцентных белков. Флуоресцентные белки стали чрезвычайно популярными инструментами для визуализации *in vivo* и особенно для изучения локализации, подвижности и взаимодействия белков в живых клетках. В качестве флуоресцентных маркеров наиболее часто используются гены зеленого (GFP) и красного (RFP) флуоресцентных белков [1].

В данном исследовании мы использовали TurboRFP – красный флуоресцентный белок, полученный на основе природного белка из морского анемона *Entactmaea quadricolor* [34]. Данный белок характеризуется: быстрым созреванием при 37°C, сверхъяркой флуоресценцией, высокой фотостабильностью и pH стабильностью, преобладая более чем в два раза белок DsRed2. TurboRFP может экспрессироваться и обнаруживаться в широком спектре организмов. В отличие от белков группы DsRed (DsRed2, DsRed-Express) при длительной экспрессии TurboRFP в клетках млекопитающих не наблюдается артефактного накопления репортера в аппарате Гольджи.

Благодаря высокой скорости созревания, TurboRFP идеально подходит для контроля эффективности трансфекции и анализа генной

экспрессии. Он может быть детектирован в клетках уже через 8 часов после трансфекции. Дестабилизированная версия, обладающая малым полупериодом распада, позволяет проводить мониторинг быстрых изменений активности промоторов в живых системах.

Выделяют два основных метода маркирования бактериальных клеток – сделать так, чтобы ген флуоресцентного белка работал в плазмиде, и встраивание маркерного гена в хромосому при помощи мобильного генетического элемента – транспозона, обычно Tn5. Выбор между хромосомной и плазмидной экспрессией генов зависит от конкретной задачи. Хромосомная экспрессия обладает преимуществом стабильности, но имеет ряд недостатков. Встраиваемый ген присутствует только в одной копии, что ограничивает уровень продукции целевого белка. Кроме того, случайная интеграция гена в хромосому может привести к мутациям, изменяющим свойства изучаемого штамма. Плазмидная экспрессия лишена этих недостатков, обеспечивая высокую продукцию белка. Однако существует риск случайной элиминации введенной конструкции в отсутствие селектирующего маркера, что делает маркирование клеток нестабильным [2].

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

1.8 Микроскопирование в микробиологии

Микроскопия до сих пор остается основным методом изучения микроорганизмов. Существует несколько видов микроскопии, каждый из которых имеет свои преимущества и специфические возможности.

Наиболее распространенным методом является оптическая микроскопия. Долгое время в нем использовался обычный дневной свет, и ведущую роль в процессе изучения играла увеличительная способность линзы.

Световой микроскоп – это сложный оптический прибор, позволяющий изучать мельчайшие объекты, невидимые невооруженным глазом, в значительно увеличенном виде. Современные световые микроскопы предлагают широкий спектр возможностей для анализа образцов в светлостольной, темностольной, иммерсионной, фазово-контрастной и люминесцентной микроскопии. В светлом поле зрения (микроскопия в проходящем свете) свет проходит через образец, создавая контраст между светлыми и темными участками, а в темном поле зрения свет рассеивается от объекта, создавая яркое изображение на темном фоне. Эффект темного поля создается при помощи специального конденсора (параболоид или кардиоид) [8].

Преимущества светового микроскопа:

1. Световые микроскопы отличаются простотой настройки и использования.
2. Благодаря небольшим размерам и легкости, световые микроскопы удобно использовать в лабораториях, транспортировать и хранить.
3. Световые микроскопы обеспечивают четкое и детальное изображение исследуемых объектов, позволяя изучать их структуру.

Недостатки светового микроскопа:

1. Световые микроскопы имеют ограничения в максимальном увеличении, что может быть недостаточным для изучения очень мелких объектов.
2. В сравнении с электронными микроскопами, световые микроскопы обладают более низкой разрешающей способностью, что может ограничивать возможности детального изучения некоторых объектов.

3. Световые микроскопы требуют дополнительного источника освещения для работы. Это может вызывать сложности в условиях с недостаточным освещением

Фазово-контрастная микроскопия – это метод исследования объектов, неокрашенных и малоконтрастных, которые не видны при обычной световой микроскопии. Контрастность изображения достигается путем сдвига фазы световой волны [6]. Живые клетки микроорганизмов слабо поглощают свет и изменяют только фазу проходящих лучей, что делает их малоконтрастными. Фазово-контрастная микроскопия преобразует фазовые изменения в амплитудные, делая возможным получение четкого изображения структур разной плотности.

Люминесцентная микроскопия – это метод, позволяющий наблюдать объекты, способные пропускать свет после поглощения энергии. Этот свет, называемый люминесценцией, отличается от падающего света более длинной волной. Существует два типа люминесценции: первичная и вторичная. В случае первичной люминесценции объект сам по себе содержит вещества, способные светиться при облучении ультрафиолетовым светом. Однако большинство объектов не обладают такой способностью. В таких случаях применяют специальные красители – флуорохромы, которые способны флуоресцировать. Эти красители позволяют сделать видимыми объекты, которые иначе были бы неразличимы. Интересно отметить, что вещества, имеющие определенный цвет при обычном освещении, могут приобретать совершенно другой цвет при освещении ультрафиолетовым светом. В результате объект, невидимый в ультрафиолетовом свете, может приобрести яркий блеск после обработки его флуорохромом [8].

Флуоресцентная микроскопия – это метод, позволяющий визуализировать биологические объекты на уровне клеток, органелл и даже молекул. Она основана на явлении флуоресценции, при котором молекулы поглощают свет определенной длины волны и затем испускают свет с более длинной волной.

Объект исследования метят флуоресцентными красителями (флуорохромами), которые связываются с определенными структурами или молекулами. Объект освещается светом с определенной длиной волны, соответствующей максимуму поглощения флуорохрома. Поглощенный свет заставляет флуорохромы излучать свет с более длинной волной, который затем регистрируется детектором. Сигнал от детектора обрабатывается компьютером, чтобы получить изображение объекта.

Преимущества флуоресцентной микроскопии:

1. Флуоресцентный микроскоп обладает высокой чувствительностью, позволяя визуализировать очень слабые сигналы.
2. Специфичность – флуорохромы можно выбрать таким образом, чтобы они связывались с конкретными структурами или молекулами.
3. Конфокальная и двухфотонная микроскопия позволяют создавать трехмерные изображения.

Конфокальная микроскопия: использует лазерный луч для сканирования объекта, что позволяет получать изображения с высоким разрешением и глубиной проникновения.

Двухфотонная микроскопия: использует два фотона, которые одновременно поглощаются флуорохромом, что позволяет исследовать более глубокие слои образца.

Недостатки флуоресцентной микроскопии:

1. Флуоресцентные красители со временем теряют свою яркость под воздействием возбуждающего света. Это может ограничивать продолжительность наблюдения и исказить полученные данные. Для решения этой проблемы используются специальные красители с повышенной флоростабильностью и методы, такие как флуоресцентная корреляционная спектроскопия (FCS), где используется короткий импульс возбуждающего света.
2. Возбуждающий свет может повреждать клетки и ткани. Для минимизации фототоксичности используются специальные красители с

низкой фототоксичностью и методы, такие как конфокальная микроскопия, где используется меньшая доза возбуждающего света.

3. Некоторые клетки и ткани сами по себе флуоресцируют, создавая фоновый шум и затрудняя интерпретацию данных. Для предотвращения автофлуоресценции этой проблемы используются специальные красители с высокой специфичностью и методы, такие как многофотонная микроскопия, где возбуждается только целевой краситель.

4. Флуоресцентная микроскопия ограничена дифракционным пределом света, что составляет около 200 нм. Это не позволяет наблюдать детали меньше этого размера.

5. Для флуоресцентной микроскопии требуется специальная подготовка образцов, которая может быть сложной и трудоемкой. Например, клетки нужно фиксировать, окрашивать флуоресцентными красителями и монтировать на предметное стекло.

6. Флуоресцентная микроскопия является дорогим методом, требующим специального оборудования и расходных материалов.

7. Не все молекулы могут быть мечены флуоресцентными красителями, что ограничивает возможности метода.

Суперразрешающая микроскопия: применяет различные методы, чтобы преодолеть дифракционный предел света и получить изображения с разрешением, превосходящим предел оптического микроскопа.

FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy): измеряет время жизни флуоресценции, которое зависит от молекулярного окружения, позволяя получить информацию о биологических процессах.

Электронная микроскопия – используется для изучения ультраструктуры микроорганизмов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа [9]. Данный метод предполагает использование электронного микроскопа, в котором для освещения объектов вместо светового пучка используются электронные лучи (поток электронов). В зависимости от способа взаимодействия

электронного пучка с образцом выделяют два типа электронных микроскопов: просвечивающую (ПЭМ) и сканирующую (СЭМ) [6].

Преимущества электронного микроскопа:

1. Возможность наблюдать объекты с гораздо более высоким разрешением.
2. Возможность изучения внутренних структур исследуемых объектов.
3. Электронные микроскопы могут анализировать объекты, не пропускающие свет, расширяя спектр исследуемых материалов без повреждения образца.

Недостатки электронного микроскопа:

1. Подготовка образца. Образцы требуют специальной подготовки, которая может быть трудоемкой и времязатратной. Процессы обезвоживания, фиксации и покрытия образцов могут исказить его структуру. Образцы должны быть маленькими и тонкими, чтобы электроны могли их проходить.
2. Микроскоп работает в вакууме, что требует специальной техники для подготовки образца и может повредить некоторые типы материалов. Помимо этого, для проведения микроскопии исследуемые материалы должны соответствовать определенной толщине.
3. Электронные микроскопы очень дороги, как в плане покупки, так и в плане обслуживания.
4. Сложная эксплуатация: требуется квалифицированный персонал для работы и обслуживания.
5. Чёрно-белое изображение: электронные микроскопы не могут отображать цвета.
6. Хотя электронные микроскопы могут давать более высокое разрешение, чем оптические, они не могут достичь атомного уровня во всех случаях.
7. Интенсивный пучок электронов может повредить образец, особенно при увеличении.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) — это метод, позволяющий получать изображения поверхности материалов с атомным разрешением. Он основан на взаимодействии между острием иглы и поверхностью образца.

Тонкое острие прикрепляется к микроскопическому рычажку, который сканирует поверхность образца. 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.

АСМ может использоваться для изучения различных материалов, включая металлы, полимеры, керамику, биологические образцы и т.д.

Основные преимущества АСМ:

1. Высокое пространственное разрешение: АСМ позволяет получать изображения с атомным разрешением, что дает возможность изучать структуру материалов на наноуровне.
2. Может применяться для изучения различных типов материалов, включая твердые, мягкие, проводящие, непроводящие, биологические и т.д.
3. АСМ обладает возможностью получать трехмерные изображения поверхности, что позволяет понять ее топографию и структуру.
4. С помощью АСМ можно исследовать механические свойства материалов, такие как жесткость, упругость, вязкость и адгезия.
5. АСМ позволяет манипулировать отдельными атомами и молекулами, что открывает возможности для создания новых материалов и устройств.
6. Возможность работать в различных средах, включая воздух, вакуум, жидкости и биологические среды.
7. АСМ является неразрушающим методом исследования, что позволяет изучать образцы без их повреждения.

Таким образом, выбор типа микроскопии зависит от конкретной задачи, которую необходимо решить. В данной работе использовался

флуоресцентный метод микроскопии для исследования флуоресцентно-меченных бактерий на непрозрачных образцах.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Культивирование бактерий на питательной среде

Для изучения воздействия модифицированных поверхностей материалов на способность к адгезии были использованы штаммы почвенных бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, которые были маркированы красными флуоресцентными белками TurboRFP за счет введения в клетки плазмиды pJN105TurboRFP (рисунок 1).

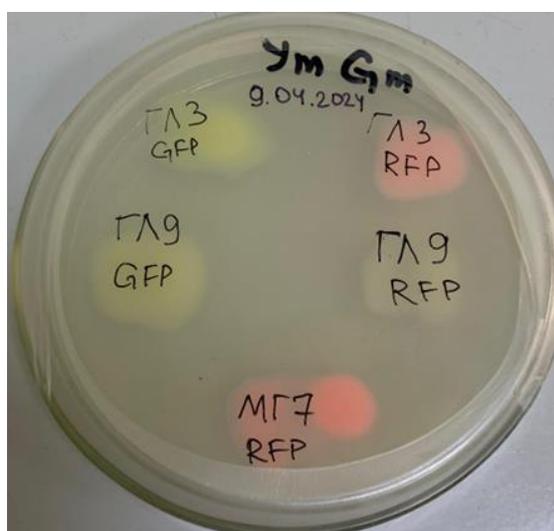


Рисунок 1 – Колонии бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, маркированные флуоресцентными белками

Бактерии культивировали в жидкой маннитно-дрожжевой (УМ) среде (Рис. 3). УМ-среда является одной из ключевых сред для культивирования клубеньковых бактерий. Она представляет собой жидкую или плотную питательную среду, содержащую маннит в качестве углеводного источника и дрожжевой экстракт в качестве питательного вещества [12].

Состав УМ-среды:

1. D-Mannitol – 1 г.
2. Дрожжевой экстракт – 0,04 г.

3. Дистиллированная вода – 100 мл.

Данные компоненты смешивали до однородного состояния, после чего среду помещали для стерилизации в автоклав на 30 минут при температуре примерно 121°C.

В готовую среду (рисунок 2) после остывания добавляли:

1. Соль (I) (KH_2PO_4 - 2%, K_2HPO_4 - 5%, FeCl_3 – 0,5%) – 1 мл.
2. Соль (II) ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2%, NaMoO_4 – 0,5%, CaCl – 2%) – 1 мл.
3. Антибиотик Гентамицин (37,5 мкл/100 мл).



Рисунок 2 – Приготовленная маннитно-дрожжевая среда

Засевали бактерии *R. leguminosarum*, маркированные красными флуоресцентными белками TurboRFP, на жидкую питательную среду с помощью стерильной микробиологической петли. Бактерии были нанесены на стенку колбы со средой точно, под небольшим наклоном. Для предотвращения загрязнения другими микроорганизмами, все манипуляции с клетками проводились в условиях стерильности, в ламинарном боксе. Культуру бактерий инкубировали в термошейкере при 27°C в течение 24-48 часов.

2.2 Обработка материалов культурой бактерий

Перед культивированием в суспензии бактерий каждый образец из титана и пластика был предварительно подвергнут процедуре промывки и стерилизации. Для этого в каждую пробирку, содержащую 100 мкл детергента 7X и 10 мл дистиллированной воды, клали по одному образцу материала и после встряхивания оставляли на 10 минут. Затем поверхность промывали, обмакивая каждый материал по пять раз в дистиллированную воду.

После промывания образцы были подвергнуты процедуре стерилизации с использованием ультразвуковой ванны (рисунок 3), содержащей специальный раствор из:

1. 1 мл детергента 7X
2. 800 мл дистиллированной воды

В течение 10 минут, при температурном режиме 25-26°C, под воздействием ультразвуковых колебаний создавались механические силы, способствующие очистке и стерилизации поверхностей материалов.



Рисунок 3 – Ультразвуковая ванна

Затем, после ультразвуковой очистки, титановые пластинки помещались в 70% спирт на 1 час, по истечении времени, образцы промывались в стерильной воде трижды для удаления остатка спирта

Образцы подсушивали и выдерживали под УФ лампой в ламинарном боксе в течение 5-10 минут. Подготовленные образцы размещали на дно чашки Петри, заполняли средой с культурой бактерий *R. leguminosarum* и инкубировали в термошейкере при 28°C в течение 4 часов.

После инкубации образцы несколько раз промывались дистиллированной водой для удаления излишек бактерий и подсушивались на фильтровальной бумаге.

2.3 Микроскопический анализ

Перед микроскопированием образцы приклеивались с помощью двухстороннего скотча на предметное стекло для лучшего удержания образца и его фиксации (рисунок 4).

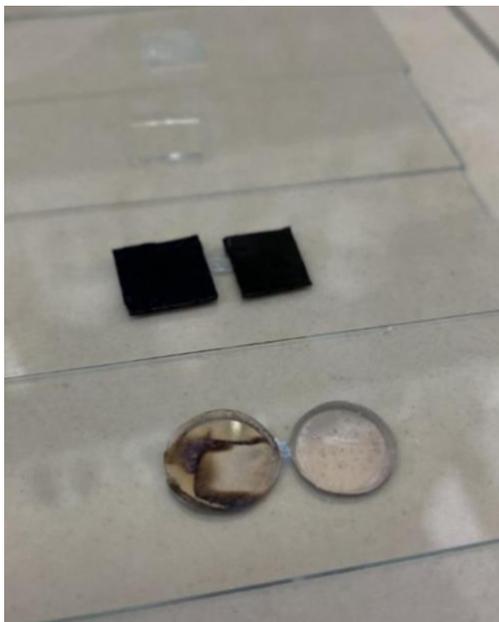


Рисунок 4 – Образцы пластика и титана

Для оценки степени адгезии бактерий использовался флуоресцентный микроскоп Biozero VZ-8100 (Keyence, Япония) (рисунок 5).

Флуоресцентные белки наблюдали с помощью специальных светофильтров, подобранных для определения красного флуоресцентного белка (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм). Использовались два разных объектива (20х и 4х) для наблюдения белка с различным увеличением.



Рисунок 5 – Флуоресцентный микроскоп Biozero VZ-8100 (Keyence, Япония)

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Поверхность клеток бактерий рода *Rhizobium* содержит множество полисахаридов, таких как липополисахариды, капсулярные полисахариды, гелеобразующие полисахариды, экзополисахариды, К-антигены, циклические β -(1,2) глюканы и глюкоманнаны [30, 38]. ЭПС ризобий играют ключевую роль в формировании биопленок, создавая матрикс, который обеспечивает физическую защиту и барьер от неблагоприятных условий окружающей среды [35]. В этой связи было интересно провести анализ влияния модификации поверхности различных материалов, используемых в медицине. К таковым можно отнести различного рода полимеры и металлы, из которых чаще всего изготавливают инструменты, имплантаты, протезы и т.д., которые непосредственно имеют контакт с органами пациентов, и зарастание их бактериями будет негативно сказываться на их выздоровление.

В данной работе мы анализировали различные варианты модификации пластика, полученными сотрудниками Московского физико-технического института. Для анализа адгезии бактерий на поверхности исследуемых образцов мы провели их обработку суспензией бактерий *Rhizobium leguminosarum* штамма ГЛЗ. Для возможности наблюдения степени зарастания материала бактериями нами был использован метод прижизненного окрашивания бактерий флуоресцентными белками путем их трансформирования плазмидой, несущей ген красного флуоресцентного белка TurboRFP. Это дало нам возможность обнаруживать микроорганизмы на поверхности непрозрачных материалов без их фиксации и последующего окрашивания, поскольку это могло повлиять на структуру поверхности анализируемого материала. Анализ бактерий на поверхности проводили с помощью флуоресцентной микроскопии.

Вначале нами было проведено исследование степени адгезии на образце пластика без предварительной обработки (рисунок 6).

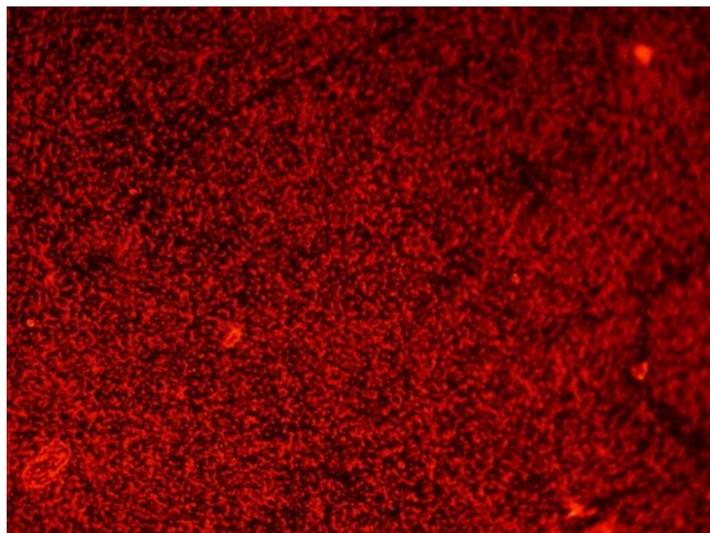


Рисунок 6 – Образец 1. Пластик без предварительной обработки.
Флуоресцентная микроскопия (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Из полученных изображений микроскопирования видно, что ризобии довольно хорошо сорбируются на поверхности исследуемого материала. Необработанная поверхность не обладает антибактериальными свойствами, и бактерии на ней могут свободно образовывать биопленки.

Далее мы таким же образом проанализировали образцы, поверхности которых были подвергнуты определенным модификациям.

Образец 2. При анализе данного образца (рисунок 7) было выявлено, что бактерии на ней сорбируются в меньшей степени, что говорит о позитивном влиянии данного способа обработки на антибактериальные свойства материала.

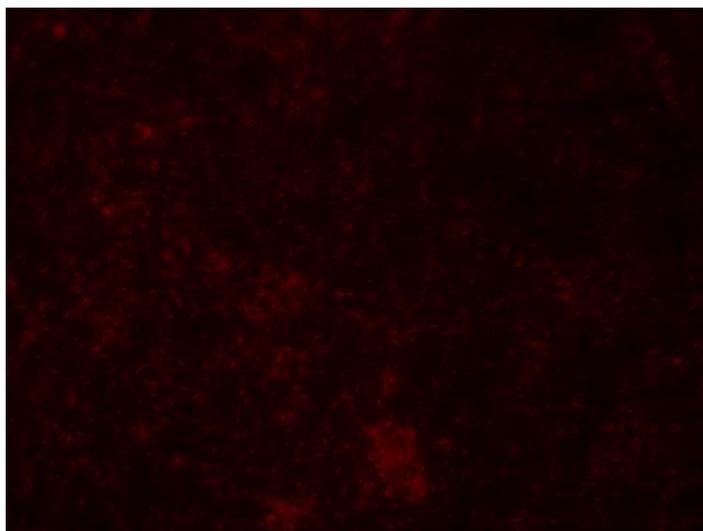


Рисунок 7 – Образец 2. Пластик с гладкой выпуклой поверхностью. Флуоресцентная микроскопия (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Образец 3.

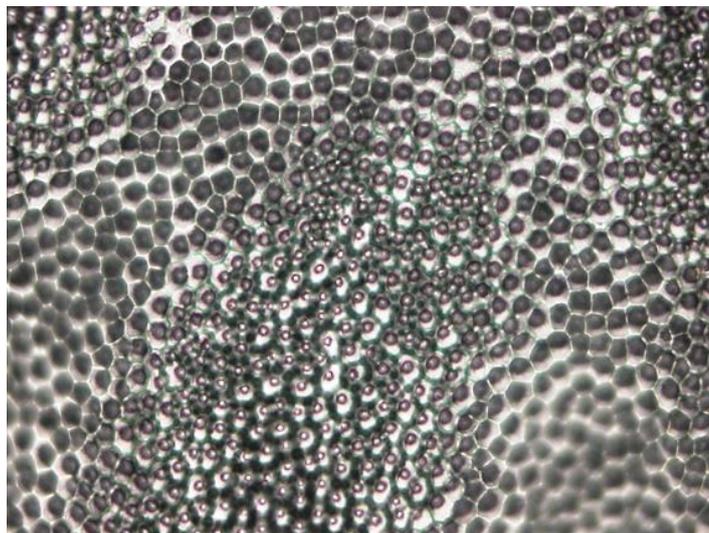


Рисунок 8 – Образец 3. Пластик с модифицированной поверхностью. Световая микроскопия

Поверхность данного образца имеет микрошероховатость, обладает бугристой формой (рисунок 8). При анализе на наличие бактерий на поверхности образца, микроорганизмы обнаружены не были, что говорит об

отличном антибактериальном свойстве данного вида модификации поверхности пластика (рисунок 9).

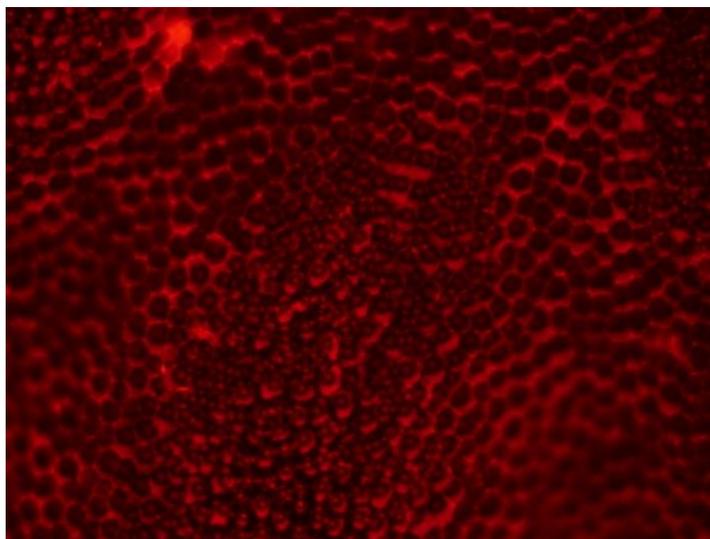


Рисунок 9 – Образец 3. Красные зоны соответствуют автофлуоресценции. Флуоресцентная микроскопия (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Образец 4.

Поверхность данного образца пластика (рисунок 10) также, как и в предыдущем варианте обладает шероховатой бугристой формой. При анализе на наличие микроорганизмов на поверхности было обнаружено, что по сравнению с образцом 3 у данного варианта бактерии прикреплялись в складках между бугорками. Хотя по сравнению с вариантом без обработки данный способ модификации поверхности и уменьшает количество адгезированных бактерий, но тем не менее не исключает прикрепления микроорганизмов к поверхности образца.

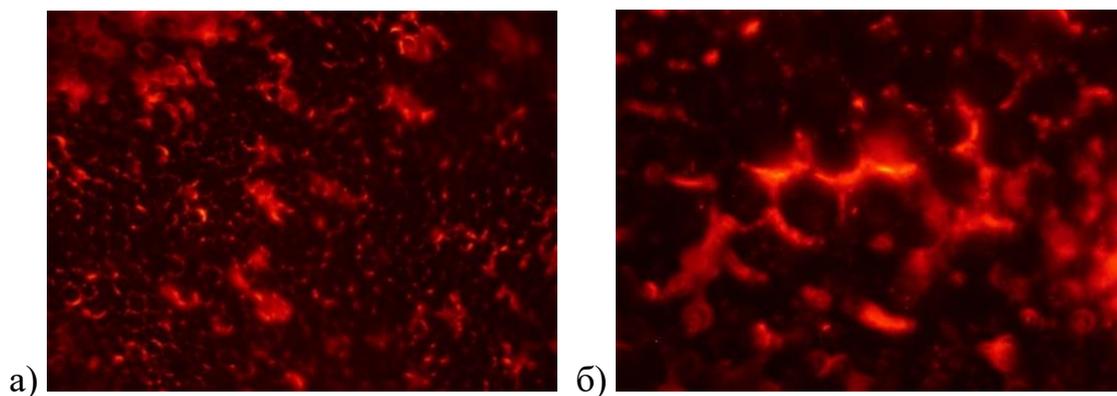


Рисунок 10 – Образец 4. Пластик с шероховатой модифицированной поверхностью: а) 60-кратное увеличение б) 300-кратное увеличение
Флуоресцентная микроскопия (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Образец 5.

Данный образец (рисунок 11) имеет гладкую поверхность. Анализ наличия бактерий на поверхности пластика с данным вариантом модификации показал, что бактерии не адгезируются на данном образце. Это говорит также о высоком антибактериальном свойстве данного способа обработки поверхности пластика. Красные пятна на фотографии не являются бактериями.

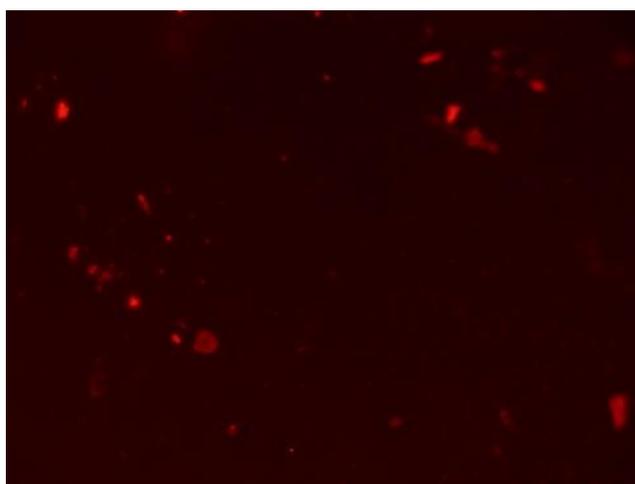


Рисунок 11 – Образец 5. Пластик с гладкой модифицированной поверхностью. Флуоресцентная микроскопия (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Компоненты поверхности ризобийных клеток, экзополисахарид (EPS) и липополисахарид (LPS), играют важную роль в определении адгезивных свойств ризобий. В данной работе мы специально выбрали ризобии для анализа интенсивности адгезий бактерий к модифицированным поверхностям пластика, поскольку надо было выявить влияние на данный процесс внешних полисахаридов клеточной стенки бактерий. Бактерии *Rhizobium leguminosarum*, по нашему мнению, оказались подходящими кандидатами, поскольку поверхность ризобий характеризуется множеством полисахаридов, таких как липополисахарид (LPS) и кислые капсульные полисахариды (CPS), причем некоторые из них могут содержать лектиносвязывающие эпитопы. По полученным нами данным модификация поверхности полимерных материалов весьма эффективно может сказываться на их антибактериальных качествах. Для каждого рода медицинского изделия можно таким образом подобрать наиболее эффективную против бактерий форму поверхности.

Титан широко используется в медицинской практике для изготовления имплантов и других медицинских устройств. При использовании имплантов и протезов возникает проблема их контаминации и зарастания микроорганизмами. Это может привести к ухудшению заживления ран, инфекциям, болевым ощущениям и прочим осложнениям. 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 12).

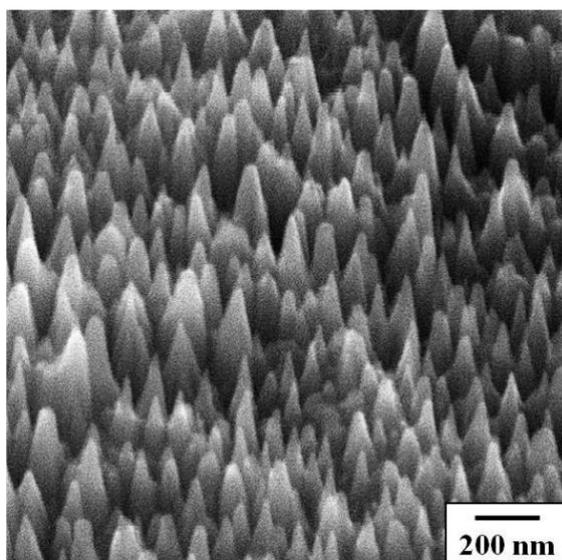


Рисунок 12 – Электронное микроскопическое изображение поверхности наноструктурированного Ti после облучения Ag⁺ с высокой энергией 30 кэВ (Letters on Materials 13 (4), 2023 pp. 373-376)

Мы анализировали влияние структурирования поверхности на антибактериальные свойства материала (рисунок 13).

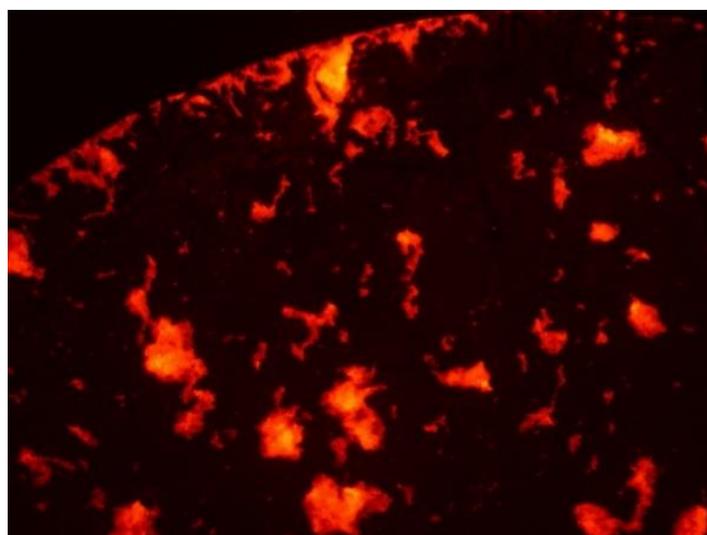


Рисунок 13 – Образец титана с немодифицированной поверхностью, обработанный бактериями *Rhizobium leguminosarum*. Флуоресцентная микроскопия (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

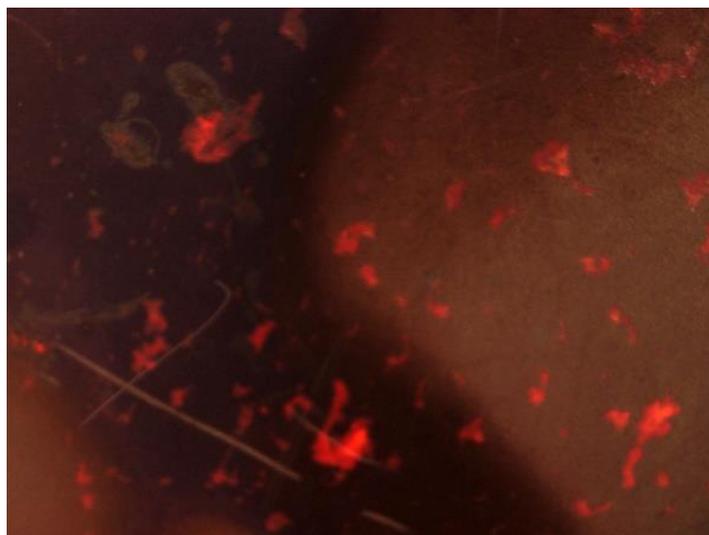


Рисунок 14 – Образец титана с модифицированной поверхностью, обработанный бактериями *Rhizobium leguminosarum*. Флуоресцентная микроскопия (возбуждение 540/25 нм, излучение 605/55 нм)

Из результатов анализа видно, что подобная модификация поверхности титана в отношении ризобий не оказывает никакого влияния на степень их адгезии (рисунок 14).

По-видимому, полисахаридная капсула на поверхности бактерий является защитным компонентом от повреждающих клетки шипов, что дает данным бактериям вполне успешно образовывать на данном материале образования в форме биопленки.

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. Это позволит повысить эффективность медицинских устройств, снизить риск возникновения инфекций у пациентов, связанных с медицинскими процедурами, и продлить срок службы изделий.

Модификация поверхности титана не повлияла на адгезию *R. leguminosarum*. Это может быть связано с тем, что полисахариды на поверхности клеток ризобий являются своего рода защитой от механического повреждения клеток, что было и продемонстрировано на модифицированном образце титана. Необходимо продолжить исследования для поиска новых способов модификации титана, способных эффективно препятствовать адгезии бактерий.

Исследование влияния модификации поверхности пластика на адгезию ризобий показало, что обработка поверхностей в большинстве случаев уменьшает их способность к прикреплению бактерий. Таким образом, микроструктура поверхности пластика, в том числе шероховатость, также играет значительную роль в адгезии бактерий.

Полученные результаты имеют важное практическое значение для разработки новых хирургических инструментов, имплантатов и расходных материалов с антибактериальными покрытиями, которые могут быть использованы в различных медицинских областях, таких как хирургия, стоматология, ортопедия и другие.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что флуоресцентно-меченные микроорганизмы являются удобным инструментом для выявления взаимодействия бактерий с различными поверхностями материалов, в том числе и непрозрачных.
2. Показано, что путем модификации поверхности пластика можно добиться высоких антибактериальных свойств материала против определенных групп бактерий.
3. Модификации поверхности металла титана с образованием микрошипов не оказывает никакого влияния на адгезию на ней бактерий *R. leguminosarum*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баймиев, Ан.Х. Получение флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* / Ан.Х. Баймиев, Р.С. Ямиданов, Р.Т. Матниязов, Д.К. Благова, Ал.Х. Баймиев, А.В. Чемерис // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45. – № 6. – С. 984-991.
2. Благова, Д.К. Микросимбионт колорадского жука *Enterobacter* spp экспрессирующий ген *gfp*-белка для исследования взаимодействия в системе растение-хозяин-фитофаг / Д.К. Благова, А. В. Сорокань, Г. В. Беньковская // Доклады Башкирского университета. – 2018. – Т. 3. – №4. – С. 366-370.
3. Вершинина, З.Р. Влияние сверхэкспрессии гена *gusR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum* / З. Р. Вершинина, О. В. Чубукова, Ю. М. Никоноров, Л. Р. Хакимова, А. М. Лавина, Л. Р. Каримова, Ан. Х. Баймиев, Ал. Х. Баймиев // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 2. – С. 191-203.
4. Вершинина, З.Р. Экзополисахариды *Rhizobium leguminosarum* – краткий обзор / З.Р. Вершинина, А.М. Лавина, О.В. Чубуткова // Биомика. – 2020. – Т. 12. – № 1. – С. 27-49.
5. Лавина, А.М. Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов в формировании биопленок *Rhizobium leguminosarum*: дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / Лавина Анна Михайловна. – Уфа, 2021. – 198 с.
6. Литусов Н.В., Бактериоскопические методы исследования. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во ГБОУ ВПО УГМУ, 2015. – 55 с.
7. Лобанов, А.Н. Продукция экзополисахаридов бактериями *Rhizobium leguminosarum* при периодическом культивировании / А.Н. Лобанов, Т.В. Полюдова // Биомика. – 2020. – Т. 12. – № 2. – С. 227-231.

8. Микробиология с основами вирусологии: методы микроэкологического исследования наземных, водных и воздушных экосистем. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: лаб. практикум / С.В. Прудникова, Н.Д. Сорокин, Н.И. Сарматова и др. - Электрон. дан. - Красноярск: ИПК СФУ, [2008]. - 1 электрон. опт. диск (DVD).
9. Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л. Общая микробиология: учебно-методическое пособие для студ мед вузов – Пенза, 2012. – 65 с.
10. Соломай, Т.В. Профилактика заболеваний, ассоциированных с биопленками, образованными на абиотических поверхностях в медицинских организациях / Т.В. Соломай // Журнал Санитарный врач. – 2017. – № 7 – С. 37-45.
11. Хакимова, Л.Р. Роль бактериальных адгезинов и других компонентов клеток на начальных этапах растительно-микробных взаимодействий / Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, Э.Р. Сербаяева, Л.Р. Садыкова, З.Р. Вершинина, Ал.Х. Баймиев // Биомика. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 325-339.
12. Якименко, М. В. Оценка интенсивности роста штаммов *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii* дальневосточной селекции на средах с различными углеводами / М.В. Якименко, С.А. Бегун, А.И. Сорокина // Достижения науки и техники АПК. – 2020. – Т. 34. – № 6. – С. 33-37.
13. Abdian P.L., Malori M.S., Caramelo J.J., Checchi A.M., Russo D.M., Zorreguieta A., Berretta M.F., Benintende G. Fusion of a bacterial cadherin-like domain and green fluorescent protein as a specific probe to study biofilm matrix formation in *Rhizobium* spp. // Microbiology (Reading). – 2022. – Vol. 168. – №12. DOI: 10.1099/mic.0.001284. ID: 36748557.
14. Al-Ahmad A., Wiedmann-Al-Ahmad M., Fackler A., Follo M., Hellwig E., Bächle M., Hannig C., Han J.S., Wolkewitz M., Kohal R. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials // Journal Archives of Oral Biology. – 2013. – Vol. 58. – №9. – P. 1139-1147.

15. Basile L.A., Lepek V.C. Legume-rhizobium dance: an agricultural tool that could be improved? // *Microb Biotechnol.* – 2021. – Vol. 14. – №5. – P. 1897-1917. DOI: 10.1111/1751-7915.13906.
16. Castellane T.C.L., Persona M.R., Campanharo J.C., de Macedo Lemos E.G. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications // *International journal of biological macromolecules.* – 2015. – Vol. 74. – P. 515-522. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.007.
17. Chakraborty S., Valdés-López O., Stonoha-Arther C., Ané J.M. Transcription Factors Controlling the Rhizobium-Legume Symbiosis: Integrating Infection, Organogenesis and the Abiotic Environment // *Plant Cell Physiol.* – 2022. – Vol. 63. – №10. – P. 1326-1343. DOI: 10.1093/pcp/pcac063.
18. Chourifa H., Bouloussa H., Migonney V., Falentin-Daudré C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications // *Acta Biomater.* – 2019. – Vol. 1. – №83. – P. 37-54. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.10.036.
19. Davey M.E., O'toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2000. – Vol. 64. – №4. – P. 847-867. DOI: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000.
20. Dong J., Signo K.S.L., Vanderlinde E.M, Yost C.K., Dahms T.E.S. Atomic force microscopy of a *ctpA* mutant in *Rhizobium leguminosarum* reveals surface defects linking CtpA function to biofilm formation // *Journal of Microbiology.* – 2011. – Vol. 157. – №11. – P. 3049-3058.
21. Downie J.A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2010. – Vol. 34. – P. 150-170. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x
22. Frederix M., Edwards A., Swiderska A., Stanger A., Karunakaran R., Williams A., et al. Mutation of *praR* in *Rhizobium leguminosarum* enhances root biofilms, improving nodulation competitiveness by increased expression of

attachment proteins // Journal of Molecular Microbiology. – 2014. – Vol. 93. – №3. – P. 464-487.

23. Gonzalez V., Santamaria R.I., Bustos P., Hernandez-Gonzalez I., Medrano-Soto A., MorenoHagelsieb G., Chandra Janga S., Ramírez M.A., Jiménez-Jacinto V., Collado-Vides J., Davila G. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103 – №10. – P. 3834-3839. DOI:10.1073/pnas.0508502103

24. Gottenbos B., Grijpma D.W., Feijnen J., Busscher H.J, van der Mei H. C., Feijen J., Busscher H.J. Antimicrobial effects of positively charged surface on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria // J. Antimicrobial Chemotherapy. – 2001. – Vol. 48. – №1. – P. 7-13.

25. Hibiya K., Tsuneda S., Hirata A. Formation and characteristics of nitrifying biofilm on a membrane modified with positively-charged polymer chains // J. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2000. – Vol. 18. – №2. – P. 105-112.

26. Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – Vol. 12. – №11. – P. 7898-7933.

27. Janczarek M., Kutkowska J., Piersiak T., Skorupska A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. // BMC Microbiol. – 2010. – Vol. 10. – №284. – P. 2897-2903. DOI: 10.1186/1471-2180-10-284

28. Krehenbrink M., Downie J.A. Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9. – №55. DOI: 10.1186/1471-2164-9-55.

29. Krol J.E., Mazur A., Marczak M., Skorupska A. Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum* // Genomics. – 2007. – Vol. 89. – №2. – P. 237-247. DOI: 10.1016/j.ygeno.2006.08.015

30. Laus M.C., Logman T.J., Lamers G.E., Van Brussel A.A., Carlson R.W., Kijne J.W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin // *Mol Microbiol.* – 2006. – №6. – Vol. 59. – P. 1704-1713. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05057.x.
31. Laus M.C., Van Brussel A.A.N., Kijne J.W. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and nodulation of *Vicia sativa* root hairs // *Mol Plant Microbe Interact* – 2005. – Vol. 18. – №36. – P. 533-538. DOI: 10.1094/MPMI-18-0533.
32. Li P., Yin R., Cheng J., Lin J. Bacterial Biofilm Formation on Biomaterials and Approaches to Its Treatment and Prevention // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – №14. – P. 11680. DOI: 10.3390/ijms241411680.
33. Matthyse A.G., Kijne J.W. Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. In *The Rhizobiaceae; Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. - P. 235-249.
34. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W., Chudakov D.M. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime // *Nat Methods.* – 2007. – Vol.4. – №7. – P. 555.
35. Rinaudi L.V., Giordano W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia // *FEMS Microbiol Lett.* – 2010. – Vol. 304. – №1. – P. 1-11. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01840.x.
36. Russo D.M., Abdian P.L., Posadas D.M., Williams A., Voza N., Giordano W., Kannerberg E, Downie JA, Zorreguieta A. Lipopolysaccharide O-chain core region required for cellular cohesion and compaction of in vitro and root biofilms developed by *Rhizobium leguminosarum* // *Appl Environ Microbiol.* – 2015. – Vol. 81. – №3. – P. 1013-1023. DOI: 10.1128/AEM.03175-14.
37. Russo D.M., Williams A., Edwards A., Posadas D.M., Finnie C., Dankert M., Downie J.A., Zorreguieta A. Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm

- formation by *Rhizobium leguminosarum* // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188. – №12. – P. 4474-86. DOI: 10.1128/JB.00246-06.
38. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions // Microbial cell factories. – 2006. – Vol. 5. – №7. – P. 1-19. DOI: 10.1186/1475-2859-5-7
39. Smit G., Swart S., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots // *Mol Microbiol.* – 1992. – Vol. 6. – №20. – P. 2897-2903.
40. Tarsitano J., Ramis L.Y., Alonso L.G., Russo D.M., Zorreguieta A. RapD Is a Multimeric Calcium-Binding Protein That Interacts With the *Rhizobium leguminosarum* Biofilm Exopolysaccharide, Influencing the Polymer Lengths // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. DOI: 10.3389/fmicb.2022.895526.
41. Terada A., Yuasa A., Tsuneda S., Hirata A., Katakai A., Tamada M. Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization // *Journal Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2005. – Vol. 43. – №2. – P. 99-107.
42. Uhlmann E., Schweitzer L., Kieburg H., Spielvogel A., Huth-Herms K. The Effects of Laser Microtexturing of Biomedical Grade 5 Ti-6Al-4V Dental Implants (Abutment) on Biofilm Formation // *Procedia CIRP.* – 2018. – Vol. 68. – P. 184-189. DOI: 10.1016/j.procir.2017.12.044.
43. Vilarrasa J., Delgado L.M., Galofré M., Álvarez G., Violant D., Manero J.M., Blanc V., Gil F.J., Nart J. In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm over antibacterial coated titanium surfaces // *J Mater Sci Mater Med.* – 2018. – Vol. 29. – №11. – P. 164. DOI: 10.1007/s10856-018-6168-8.
44. Vozza N.F., Abdian P.L., Russo D.M., Mongiardini E.J., Lodeiro A.R., Molin S., Zorreguieta A. A *Rhizobium leguminosarum* CHDL- (Cadherin-Like-) Lectin Participates in Assembly and Remodeling of the Biofilm Matrix // *Frontiers in Microbiology.* – 2016. – Vol. 7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01608.

45. Webb J.S., Givskov M., Kjelleberg S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. // *Curr Opin Microbiol.* – 2003. – Vol. 6. – №6. – P. 578-85. DOI: 10.1016/j.mib.2003.10.014.
46. Xing R., Lyngstadaas S.P., Ellingsen J.E., Taxt-Lamolle S., Haugen H.J. The influence of surface nanoroughness, texture and chemistry of TiZr implant abutment on oral biofilm accumulation // *Clin Oral Implants Res.* – 2015. – Vol. 26. – №6. – P. 649-56. DOI: 10.1111/clr.12354.
47. Yao W.L., Lin J.C.Y., Salamanca E., Pan Y.H., Tsai P.Y., Leu S.J., Yang K.C., Huang H.M., Huang H.Y., Chang W.J. Er,Cr:YSGG Laser Performance Improves Biological Response on Titanium Surfaces // *Materials (Basel).* – 2020. – Vol. 13. – №3. DOI: 10.3390/ma13030756.
48. Young J.P.W., Crossman L.C., Johnston A.W., Thomson N.R., Ghazoui Z.F., Hull K.H., Wexler M., Curson A.R., Todd J.D., Poole P.S., Mauchline T.H., East A.K., Quail M.A., Churcher C., Arrowsmith C., Cherevach I., Chillingworth T., Clarke K., Cronin A., Davis P., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Mungall K., Norbertczak H., Rabbinowitsch E., Sanders M., Simmonds M., Whitehead S., Parkhill J. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. // *Genome Biol.* – 2006. – Vol. 7. – №4. – R34. DOI: 10.1186/gb-2006-7-4-r34.
49. Zheng S., Bawazir M., Dhall A., Kim H.E., He L., Heo J., Hwang G. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 9. DOI: 10.3389/fbioe.2021.643722.
50. Zorreguieta A., Finnie C., Downie J.A. Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component // *J Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – №5. – P. 1304-12. DOI: 10.1128/JB.182.5.1304-1312.2000.

СПРАВКА

Башкирский государственный медицинский университет

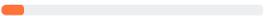
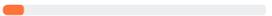
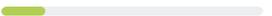
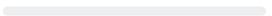
о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Мажитова А. И.
Самоцитирование
рассчитано для: Мажитова А. И.
Название работы: ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ МАТЕРИАЛОВ НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: Башкирский Государственный Медицинский Университет

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

СОВПАДЕНИЯ		8.96%	СОВПАДЕНИЯ		8.32%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		73.81%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		91.68%
ЦИТИРОВАНИЯ		17.23%	ЦИТИРОВАНИЯ		0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 19.06.2024

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 20.06.2024 09:06

Структура документа: Проверенные разделы: библиография с.49-55, титульный лист с.1, содержание с.2, основная часть с.3-48

Модули поиска: Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Интернет Плюс*; Шаблонные фразы; Издательство Wiley; Коллекция НБУ; Переводные заимствования*; ИПС Адилет; Цитирование; Библиография; СПС ГАРАНТ: аналитика; IEEE; Переводные заимствования издательства Wiley; Диссертации НББ; Перефразирования по коллекции IEEE; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Кольцо вузов; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Перефразирования по Интернету; Кольцо вузов (переводы и перефразирования); Перефразирования по Интернету (EN); Публикации РГБ; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Патенты СССР, РФ, СНГ; Публикации eLIBRARY (переводы и

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.