

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

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

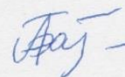
На правах рукописи

Аксюкова Екатерина Эдуардовна

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ
БИОПЛЕНОК, ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ
RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент



Ал.Х. Баймиев

Уфа – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Биопленки как форма существования микроорганизмов.....	10
1.2. Этапы формирования бактериальных биопленок.....	14
1.3. Структурно-функциональные особенности биопленок.....	17
1.4. Молекулярные сигналы в формировании биопленок.....	25
1.5. Образование биопленок ризобактериями.....	27
1.6. Бактериальные адгезины.....	31
1.7. Гены модификаторы механизмов формирования биопленок.....	33
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Объекты исследования.....	35
2.2. Питательные среды и условия культивирования.....	36
2.3. Микроскопические исследования структур биопленок.....	37
2.4. Окрашивание по методу Грама.....	37
2.5. Оценка зависимости числа живых клеток от времени и построение кривой роста микроорганизмов.....	38
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	
3.1. Проведение детальных микроскопических исследований структур, образуемых дикими и рекомбинантными по генам регуляции синтеза экзополисахаридов <i>pssA</i> , <i>rosR</i> и адгезина <i>rapA1</i> , штаммами бактерий рода <i>Rhizobium</i>	41
3.2. Оценка зависимости логарифма числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде диких и рекомбинантных штаммов бактерий рода <i>Rhizobium</i>	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	59
ВЫВОДЫ.....	62
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	63

ПРИЛОЖЕНИЕ.....	77
-----------------	----

Список сокращений и условных обозначений

БП – биопленка

ВПМ - внеклеточный полимерный матрикс

ЛПС - липополисахариды

РПС - растительно-микробный симбиоз

ЭПС - экзополисахариды

NF - Nod-факторы

PGPR - plant growth promoting rhizobacteria

QS - quorum sensing, чувство кворума

NJYM-среда – маннитно-дрожжевая среда

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В последние десятилетия число исследований, посвященных ассоциативным азотфиксирующим бактериям, существенно возросло, так как установлена значительная роль ризобактерий в жизнедеятельности многих сельскохозяйственных растений. Изучены разнообразные механизмы действия почвенных микроорганизмов, способствующих стимуляции роста растения, улучшения азотного питания, устойчивости к стрессовым факторам, повышению его продуктивности, а также сопротивлению фитопатогенным грибковым и бактериальным штаммам (Спайнк и др., 2002; Kravchenko et al., 2002).

Наиболее важными и перспективными среди ассоциативных ризобактерий являются почвенные бактерии из рода *Rhizobium* (клубеньковые бактерии) - грамотрицательные микроорганизмы, способные вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями и обеспечивать фиксацию атмосферного азота. Бактерии этого рода обладают ростостимулирующим эффектом, который обеспечивается путем синтеза веществ фитогормональной природы (цитокинины, ауксины, гиббереллины, и другие), витаминов, веществ антибиотической и противогрибковой природы, фиксации молекулярного азота и ингибирования синтеза этилена растений, улучшая поглощение питательных веществ, повышенной стрессоустойчивости, растворения неорганического фосфата и минерализации органического фосфата (Хакимова, 2017), что позволяет их отнести к PGPR-микроорганизмам (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) - бактерии ризосферы, оказывающие положительное многофункциональное воздействие на растения и повышающих их продуктивность (Бухарин и др., 2007; Pliego et al., 2011; Nadeem et al., 2014). Стимулирующие рост растений ассоциативные ризобактерии оказывают влияние на физиологические процессы растений,

урожайность и качество растительной продукции (Звягинцев и др., 1993), поэтому они все шире применяются в отечественном и мировом земледелии (Завалин, 2005). Также ризобии могут способствовать росту небобовых растений, косвенно взаимодействуя с другими полезными микроорганизмами (Цавкелова и др., 2005, 2006; Kao et al., 2005; Kang et al., 2006; Хакимова, 2017).

Основной формой существования ризобактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества - биоплёнки. Установлено, что более 90 % бактерий живет не в виде свободно существующих клеток, а в прикрепленной к субстрату форме. Связано это с тем, что в составе биопленок бактерии приобретают качественно новые свойства по сравнению с микроорганизмами в планктонной форме. Такие биопленки представляют собой бактериальные сообщества, состоящие из клеток, которые прикреплены к поверхности или друг к другу и заключены в матрикс, синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, демонстрирующие измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфичных генов (Tetz 1996; Branda et al., 2005; Zhurina et al., 2014; Окулич и др., 2017).

Физиологическое значение образования биопленок ризобиями состоит в создании и поддержании благоприятных условий для их существования, которые функционируют как структуры устойчивые к факторам стресса, таким как засуха, нехватка питательных веществ, УФ-излучение, хищничество и антибиоз (Flemming, 1993; Gilbert et al., 1997; Стрелкова и др., 2013).

В настоящее время считается общепринятым представление о том, что развитие биопленочных сообществ является одной из основных стратегий выживания микроорганизмов не только в окружающей среде, но и в организме человека и животных (Чернявский, 2013). Связано это с тем, что, биопленки являются одним из патогенетических факторов формирования хронических инфекционных процессов (Costerton et al., 1999). В первую

очередь это касается заболеваний, связанных с использованием имплантируемых устройств (катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца). С биопленочными инфекциями также связаны многие хронические заболевания - муковисцидозная пневмония, средний отит, остеомиелит, патология зубов и околозубных тканей, инфекции мочевыводящих путей. Именно биопленочные сообщества проявляют значительно более высокую устойчивость – до 1000 раз - к антибиотикам и другим лекарственным препаратам, что крайне затрудняет борьбу с инфекциями, вызванными различными патогенными бактериями (Хмель, 2014).

Изучение биопленок в настоящее время вызывает огромный интерес исследователей, главным образом, в связи с тем, что этот способ существования бактерий создает большие проблемы в медицинской практике. Данный факт подчеркивает важность изучения образования биопленок. В рамках данного исследования мы изучали образование биопленок на примере бактерий рода *Rhizobium*, связанного с определением экспрессии генов, ответственных за различные стадии развития биопленок и их регуляцию.

Цель исследования

Изучение структуры биопленок, образуемых дикими и рекомбинантными по генам регуляции синтеза экзополисахаридов *pssA*, *rosR* и адгезина *rapA1*, штаммами бактерий рода *Rhizobium*.

Задачи исследования

1. Проведение микроскопического исследования структур биопленок, образуемых ризобияльными штаммами дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702.

2. Проведение микроскопического исследования структур биопленок, образуемых исследуемыми штаммами ризобий с измененной экспрессией генов *rapA1*, *pssA* и *rosR*.

3. Построение кривой роста и размножения клеток, исследуемых ризобиальных штаммов дикого типа и рекомбинантных по генам *rapA1*, *pssA*, *rosR*.

Обоснование новизны исследования

Впервые исследованы микроскопические структуры биопленок, образуемых дикими ризобиальными штаммами: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702; и биопленки рекомбинантных штаммов : *R. leguminosarum* Pvu5 *rapA1*, *R. leguminosarum* VSy12 *rapA1*, *R. leguminosarum* THy2 *rapA1*, *R. leguminosarum* TPr4 *rapA1*, *R. galegae* 0702 *rapA1*; *R. leguminosarum* Pvu5 *pssA*, *R. leguminosarum* VSy12 *pssA*, *R. leguminosarum* THy2 *pssA*, *R. leguminosarum* TPr4 *pssA*, *R. galegae* 0702 *pssA*; *R. leguminosarum* Pvu5 *rosR*, *R. leguminosarum* VSy12 *rosR*, *R. leguminosarum* THy2 *rosR*, *R. leguminosarum* TPr4 *rosR*, *R. galegae* 0702 *rosR*.

Построены наглядные графики логарифмической кривой роста и размножения, исследуемых ризобиальных штаммов дикого типа и рекомбинантных по генам *rapA1*, *pssA*, *rosR*.

Теоретическая значимость и практическая ценность полученных результатов

В рамках данного исследования была проведена оценка биоплёнок, образованными ризобиальными штаммами дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702; и рекомбинантных штаммов по генам *rapA1*, *pssA*, *rosR*. Показано, что все исследуемые штаммы способны образовывать биопленки, однако рекомбинантные штаммы ризобий формируют более

сложные архитектурные структуры биопленок по сравнению с дикими штаммами, а высокие показатели числа живых клеток от времени не всегда коррелируют со способностью штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

В работе были раскрыты механизмы и этапы формирования биопленок исследуемых ризобияльных штаммов. Были получены результаты, которые могут быть использованы при дальнейшем изучении образования различными ризобияльными штаммами биоплёнок в ризосфере.

Используемый в работе подход раскрывает сущность процесса образования бактериями биопленок, и рекомендуется в качестве основной методики при изучении патогенов человека и животных, образующих биопленки, что может, существенно облегчить борьбу с патогенными микроорганизмами.

В данной работе нами использовались штаммы ризосферных бактерий, обладающих полезным ростостимулирующим эффектом, эффективно повышающих продуктивность растений. Данные штаммы могут быть рекомендованы как биопрепараты для использования в аграрном производстве, так как способность ризобияльных штаммов образовывать биопленки в ризосфере повышает их конкурентоспособность в естественных условиях. Тот факт, что при формировании этими штаммами биопленок происходит рост сопротивляемости растений к биотическим и абиотическим негативным факторам, имеет большое практическое значение в сельском хозяйстве.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биопленки как форма существования микроорганизмов

Ранее считалось, что единственной формой существования бактерий в природе является планктонное состояние, при котором одиночные бактериальные клетки свободно передвигаются в жидкой среде; и большинство исследований в области генетики, биохимии, физиологии бактерий были выполнены исходя из представления, того что бактериальные популяции состоят из совокупности отдельных клеток с одинаковыми свойствами или из колоний, выросших из одной клетки (Смирнова и др., 2010). Однако в 80-е годы XX века благодаря развитию микроскопической техники и молекулярно-генетических методов исследования выяснилось, что в свободно плавающем состоянии находится лишь незначительная часть бактерий, а подавляющая часть (99 %) бактерий, обитающих в природных экосистемах, существуют в иммобилизованном состоянии, при котором клетки бактерий фиксированы на твердой поверхности и плотно прижаты друг к другу, образуя специфические образования, получившие название биопленок (БП). (Смирнова и др., 2010; Глушанова и др., 2015). В 1936 году впервые были описаны биопленки микробиологами Зобелем и Андерсеном, которые посчитали, что бактерии демонстрируют большую предрасположенность к росту, находясь в колониях, связанных с поверхностями, чем к самостоятельному росту в состоянии свободного существования (Бехало и др., 2010).

В настоящее время основной частью микробиологов признано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде биопленок (Окулич и др., 2012). Согласно современным представлениям биопленка представляет собой живое, постоянно обновляющееся сообщество микроорганизмов, необратимо прикрепленных на биогенном или абиогенном субстрате и друг к другу, окруженных внеклеточным полимерным материалом (матриксом),

продуцируемым этими же бактериями (Tetz 1996; Branda et al., 2005; Zhurina et al., 2014; Глушанова и др., 2015). Такие бактериальные сообщества могут состоять из одного вида бактерий или грибов, или, что встречается более часто, могут быть полимикробными, например, содержать многочисленные разнообразные виды микроорганизмов (Афиногенова, Даровская, 2011), или же состоять как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся, некультивируемых форм.

Некоторые исследователи считают, что планктонную форму можно рассматривать лишь как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой, то есть как кратковременное состояние в жизни бактерий. К тому же, ни для одного вида бактерий не описано существование только в планктонном состоянии при всех возможных условиях роста. И этот факт, что бактерии способны образовывать сложные бактериальные сообщества, играющие важную роль в природе, был известен давно, однако феномен биоплёнки как коллективного поведения бактерий был описан только в 1992-1994 годах (рисунок 1) (Бондаренко, 2011).



Рисунок 1 - Биопленка или коллективное сообщество микроорганизмов (Чернявский, 2013)

Биопленки – это основной фенотип почти всех бактерий в естественных условиях обитания. Будучи в прикрепленном состоянии, в

составе биопленок, бактерии защищены от повреждающих факторов внешней среды и действия антибактериальных веществ в окружающей среде и организме хозяина при инфекции (Романова, Гинцбург, 2011).

Следует отметить, что рост бактерий в виде биопленок может обеспечивать и определенные преимущества:

- в производствах, охватывающих длительные биотрансформации токсичных веществ в связи с увеличенной устойчивостью бактерий к этим веществам;

- другая возможная область применения бактериальных биопленок основана на их способности оказывать подавляющий эффект на асцидии и водоросли, обрастающие корпуса кораблей (Zapata et al., 2007). Предполагают, что биопленки, образуемые бактериями с выраженными антагонистическими свойствами, могут явиться альтернативой токсичным химическим защитным покрытиям;

- при биологической очистке воды, воздуха и др. (создание микробных сообществ заданного состава, эффективно разлагающих вредные соединения);

- при применении в медицине препаратов с пробиотической активностью живых бактерий;

- в биологической борьбе с фитопатогенами, вызывающими заболевания растений (бактерии, используемые для биологической борьбы, лучше выживают в ризосфере растений и противостоят атакам фитопатогенных микроорганизмов с антагонистической активностью) (Хмель, 2014). Большой интерес в связи с борьбой с фитопатогенами представляют данные об образовании биопленок бактериями *Bacillus subtilis*, подавляющими развитие фитопатогенов на корневой системе растений (Bais et al., 2004). Показано, что пленкообразующая способность важна для закрепления бактерий антагонистов в ризосфере (Смирнова, 2010).

Однако биопленки могут стать и очень опасными, поскольку они часто возникают при различных инфекционных патологиях. Как теперь установлено, биопленки являются одним из патогенетических факторов развития хронических инфекционных процессов (Costerton et al., 1999). В первую очередь это касается заболеваний, связанных с использованием имплантируемых устройств (катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца). Течение инфекционных болезней может протекать с осложнениями именно из-за формирования в организме микробных биопленок. С биопленочными инфекциями также связаны многие хронические заболевания - муковисцидозная пневмония, средний отит, остеомиелит, патология зубов и околозубных тканей, инфекции мочевыводящих путей и другие. Считается, что до 80 % всех бактериальных инфекций человека связаны с образованием биопленок (Марданова и др., 2016).

Помимо проблем в медицине, способность бактерий формировать биопленки вызывает серьезные трудности в промышленности. Биоплёнки вызывают биокоррозию нефтепроводов, трубопроводов, в том числе и промышленного назначения, а также различного технологического оборудования, корпусов судов, нефтяных платформ. В результате возникают технические трудности, снижающие эффективность использования этого оборудования (Смирнова и др., 2010; Хмель, 2014). Серьезную опасность представляют биоплёнки для систем питьевого водоснабжения в связи с возможностью заражения воды патогенными микроорганизмами из-за низкой чувствительности биопленочных бактерий к биоцидам (Смирнова и др., 2010). В пищевой промышленности формирование бактериальных биопленок на продуктах повышает риск заражения патогенными микроорганизмами пищи и в результате появлению значимых инфекций у людей. В природных условиях биопленки могут вызывать ухудшение экологической обстановки, например, сообщество цианобактерий формирует в природных условиях пленку на поверхности

водоемов, что влечет к усугублению снабжения водных организмов кислородом и негативным изменениям качества воды. (Хмель, 2014).

1.2. Этапы формирования бактериальных биопленок

Биопленки по своей структуре – не гомогенные слои бактериальных клеток, фиксированные на поверхности, а гетерогенные во времени и в пространстве структуры с уровневой разнородностью (Симонова и др., 2017). Считается, что для образования биоплёнок единственным условием, за исключением присутствия микроорганизмов, является наличие относительно плотной и увлажненной поверхности неорганического или органического происхождения (Окулич и др., 2017).

Образование биопленок - это сложный комплексно динамический процесс, состоящий из нескольких стадий: адгезии – микроорганизмы прикрепляются к поверхности с помощью факторов адгезии, таких как реснички или пили; колонизации – межклеточной адгезии и формирования микроколоний как отправной точки формирования сложной структуры биопленки, в эту фазу происходит транскрипция генов, необходимых для продукции внеклеточных полисахаридов; созревания – процесса, требующего наличия особых коммуникативных сигналов, способных регулировать внутри БП экспрессию генов и белков, а также распределения видов (Simmons et al., 2007). Из сформированной биопленки происходит отпочкование или дисперсия планктонных микроорганизмов в окружающую среду (Окулич и др., 2017) (рисунок 2).

Более подробно динамика формирования зрелой биопленки рассмотрена далее:

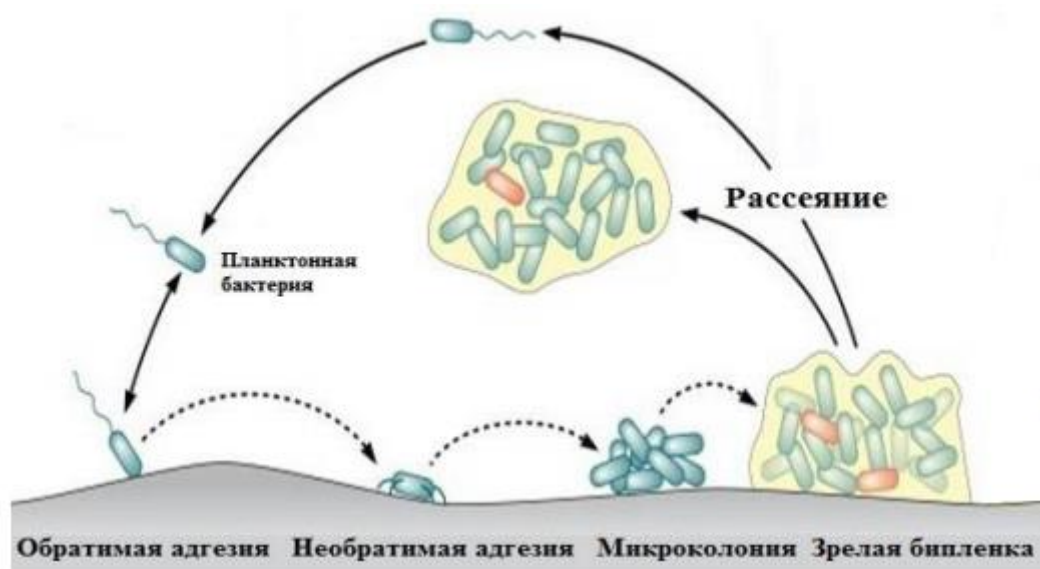


Рисунок 2 - Стадии формирования биопленок (Lebeaux et al., 2013)

Прикрепительная стадия. Развитие образования биопленки начинается с адгезии планктонных бактерий к твердой абиотической или биотической поверхности, так как именно адгезия микроорганизмов к колонизируемой поверхности является ключевым моментом, без которого образование биопленки невозможно. Адгезивность микроорганизмов зависит от большого числа различных параметров, определяемых в первую очередь видовой принадлежностью, и инициируется при формировании суммы необходимых экологических параметров (температуры, парциального давления кислорода, осмолярности, pH), опосредующих переход от планктонной формы существования к биопленочной (Симонова и др., 2017). Этот этап микробной адгезии представляет собой обратимый процесс, сопряженный с действием неспецифических физико-химических сил взаимодействия между молекулами и структурами на поверхностях микроорганизма и твердого субстрата, основанного на Ван-дер-Ваальсовых, гидрофобных и электростатических силах (Carpentier, Cerf, 1993; Pace et al., 2006, Харсеева и др., 2015). При переходе к биопленочному образу жизни большую роль у подвижных бактерий играют поверхностные органеллы - жгутики, флагеллы и пили. Неподвижные бактерии фиксируются с помощью адгезинов фимбриальной и нефимбриальной

природы, способствующих преодолению сил отталкивания при взаимодействии одноименно заряженных поверхностей (Глушанова и др., 2015). В прикреплении грамположительных бактерий участвуют тейхоевые кислоты, которые играют роль ранних адгезинов, а в прикреплении грамотрицательных микроорганизмов главную роль в адгезии и клеточной агрегации играют жгутики и фимбрии IV типа. Жгутиками обусловлено движение, которое способствует распространению и образованию клеточного монослоя на субстрате, тогда как фимбрии IV типа участвуют в клеточной агрегации за счет лектинового взаимодействия (Blango, 2010).

Стадия агрегации и размножения. На этом этапе происходит необратимая агрегация, или объединение клеток, прикрепившихся ранее к твердой поверхности. Для агрегации необходимо наличие пилей IV типа, синтез которых находится под контролем Quorum Sensing (QS) – «чувства кворума». После прикрепления и агрегации клетки начинают размножаться, образуют монослой и распространяются по поверхности субстрата с помощью высокоподвижных клеток – швермеров, формируя микроколонии (Глушанова и др., 2015). Экспериментально доказано, что начальные элементы биоплёнки могут сформироваться в течение двух часов инкубации, достигая максимальной интенсивности уже через 24 часа (Петрухина и др., 2015).

Стадия синтеза экзополисахарида. На этом этапе происходит включение генов, обуславливающих синтез экзополисахаридов и формирование основного компонента биопленки – экзополимерного матрикса, облегчающего прикрепление также вторичных колонизаторов из планктонных форм (Carpentier, Cerf, 1993). ВПМ удерживает вместе всю колонию, где происходит процесс накопления питательных веществ, и клетки начинают делиться.

Стадия созревания биопленки. В процессе созревания биопленки происходит накопление бактерий, как за счет размножения бактерий в микроколониях, так и за счет прикрепления к начальной биопленке

свободно плавающих подвижных и неподвижных бактерий разных видов. Образуется зрелая биоплёнка, которая изменяет свой размер и форму, клетки, находящиеся в глубоких слоях биоплёнки, растут медленно, а клетки, находящиеся на периферии, – быстро (Петрухина и др., 2015). ВПМ выполняет функцию защиты клеток от внешних угроз. В структуре сформированной биоплёнке образуются каналы, в которых циркулируют питательные вещества и в БП возникает собственный метаболизм, отличный от того, который существовал в отдельных клетках. Заканчивается процесс созревания биопленки формированием сообщества бактерий, иммобилизованного на твердой поверхности и окруженного полисахаридным матриксом (Симонова и др., 2017).

Стадия разрушения биопленки. Последняя стадия - процесс дисперсии биоплёнки (выброса и распространения). Сформированная зрелая биоплёнка при повышенной плотности (чрезмерном увеличении клеточной популяции) и при низком содержании питательных веществ, вступает в фазу репрессии – распада и деградации – гибели части клеток и освобождения другой части и перехода её в планктонную форму, способных через некоторое время снова прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию (Марданова и др., 2016). Этот процесс имеет большое значение, так как приводит к распространению инфекции, захвату патогенными бактериями новых мест обитания и контаминации объектов окружающей среды (Глушанова и др., 2015; Петрухина и др., 2015).

Таким образом, цикл развития биопленки завершается, бактерии вновь возвращаются к планктонному образу жизни с тем, чтобы при необходимости вновь его повторить.

1.3. Структурно-функциональные особенности биопленок

Применение лазерной конфокальной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии, позволило выявить, что живая полноценная биопленка имеет сложную архитектуру и представляет собой образования,

сформированные микроколониями бактерий (15-20 % объема) и экзополимерным матриксом (продукта жизнедеятельности самих клеток) (75-85 % объема) (Глушанова и др., 2015), и формируется на поверхности раздела фаз. Всего известно четыре типа разделов фаз, на которых развиваются микробные сообщества: жидкая среда - воздух, жидкая среда - твердая поверхность, две несмешивающиеся жидкости и твердая поверхность - воздух (Николаев, Плакунов, 2007).

Больше всего исследованы виды биопленок, формирующиеся на границе твердой и жидкой фаз, которые имеют следующие морфотипы (рисунок 3):

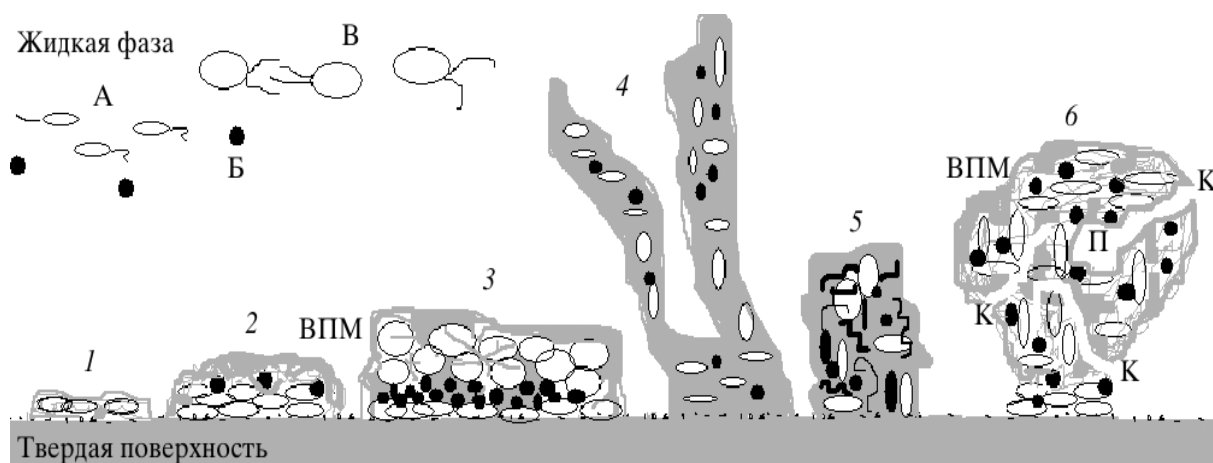


Рисунок 3 - Основные типы строения бактериальных биопленок: А, Б, В - условные изображения разных микроорганизмов. 1 - слой клеток одного вида, погруженный в матрикс из внеклеточного полимерного материала (ВПМ); 2 - неструктурированная биопленка, составленная из двух или нескольких микроорганизмов, объединенных общим матриксом; 3 - мат-слоистая структура из многих видов организмов с четко выраженной стратификацией, т.е. разделением на морфо-функциональные горизонтальные слои (например, верхний слой фототрофных организмов, средний -гетеротрофов-гидролитиков, нижний - анаэробных автотрофных или гетеротрофных организмов); 4 - биопленка с развитой поверхностью в виде лент (тяжей) из слизистого материала; 5 - зубная бляшка - в состав входят много видов бактерий, имеет определенную трехмерную структуру и ограничена в пространстве; 6 - "грибовидное" тело, с более узким основанием, расширяющееся кверху, составленное многими микроорганизмами, в структуре имеются каналы (К), полости (П) и поры (последнее не показано). В состав такой биопленки могут входить как несколько видов организмов, так и один (*P. aeruginosa*) (Николаев, Плакунов, 2007)

- простой слой клеток, сформированный одним или несколькими видами микроорганизмов, без выраженной морфологической дифференциации (выделяют только внутреннюю и наружную части) - самый примитивный тип биопленок. Такие пленки описаны для бактерий родов *Citrobacter* (Allan et al., 2002), а также для дефектных по ауторегуляции *Pseudomonas aeruginosa* (Davies et al., 1998);
- маты фотосинтезирующих (Ward et al., 1998), сульфатредуцирующих (Okabe et al., 2003) и метаногенных (MacLeod et al., 1990) бактериальных сообществ, а также сообщество микроорганизмов, развивающееся в очистных сооружениях сточных вод (Wagner et al., 2002). Маты представляют собой многовидовое сообщество, с выраженной стратификацией соответственно градиенту фактора, регулирующего структуру мата, а именно - света для фототрофов, питательных веществ, окислительного потенциала и др. для хемотрофов. Этот тип биопленок часто может достигать в толщину нескольких десятков сантиметров;
- зубные биопленки (бляшки), образованные сложным сообществом многих микроорганизмов (Kroes et al., 1999; Kolenbrander, 2000). Этот тип пленок является одним из наиболее изученных. Для него описана строгая последовательность колонизации разными микроорганизмами, типы и механизмы взаимодействия организмов. Из зубных биопленок выделены сотни видов микроорганизмов (Kolenbrander et al., 2002; Rickard et al., 2003);
- пленка с лентами-выростами, формирующаяся смешанной популяцией бактерий в условиях турбулентного потока (Stoodley et al., 1999). Эти ленты могут отрываться и способствовать расселению популяции;
- "грибы" - биопленки, сформированные одним или несколькими видами микроорганизмов со специфической трехмерной структурой, особыми функционально-морфологическими образованиями (порами, каналами, пустотами, ножками) (Klausen et al., 2003; De Beer, Stoodley,

2004.). В образовании таких дифференцированных биопленок у *P. aeruginosa* и *Serratia marcescens* важную роль играют гены, ответственные за синтез альгинатов, рамнолипидов, а также сигнальных компонентов системы "quorum sensing" (Rice et al., 2005);

- бентосные и речные осадки, а также взвешенные в воде хлопья (flocs, "речной и морской снег") и различные типы обрастаний, особенно те, которые формируются в "экстремобиоценозах" (Costerton et al., 1994; Karsten, Kühn, 1996).

Для границы вода-воздух описано 3 морфотипа:

- примитивный слой на границе воды и воздуха, когда микробы образуют пленку - описано для вибрионов (Allan et al., 2002) и бацилл (Branda et al., 2001; Morikawa, 2006);
- массивные структуры типа чайного гриба (медузомицет, гриб "комбуча") (Mayser et al., 1995; Юркевич, Кутушенко, 2002). Сообщество чайного гриба представляет собой симбиоз уксуснокислых бактерий и дрожжей многих родов. Дрожжи включены в полисахаридную строму, образованную бактериями, и вся ассоциация располагается на границе вода-воздух, достигая толщины нескольких сантиметров;
- пленка бацилл на границе жидкость-воздух, с рыхлой основной частью из цепочек клеток и плодовыми телами, образующими споры, обращенными в воздух (Branda et al., 2001; Morikawa, 2006).

В составе биопленок выделяют три основных компонента: поверхностную оболочку, клетки микроорганизмов и внеклеточный матрикс.

Поверхностная оболочка биопленок. Снаружи матрикс биопленки окружен поверхностной оболочкой, которая представляет собой часть полимерного матрикса, заключающий в себе ряд выраженных морфологических признаков. По качественному составу липиды

поверхностной оболочки, матрикса и мембран бактерий, которые образуют биопленку, практически сходны, но различаются по количеству отдельных компонентов: в оболочке и матриксе биопленки по сравнению с клеточной мембраной доминирующее значение имеют стабильные липиды, и в частности кардиолипиды (Тец, Тец, 2013). Поверхностная оболочка биопленок, имеющая липидный, мембраноподобный компонент, покрывает и окружает всё сообщество, препятствуя свободному проникновению в него различных факторов внешней среды, т.е. выполняет барьерную функцию, и служит универсальной защитой микробных сообществ от действия окружающей среды, а также придает биопленке прочность, необходимую для сохранения ее структурной целостности. (Глушанова и др., 2015).

Клеточный состав биопленок. Клетки в биопленках могут принадлежать к одному виду или включать несколько неродственных микроорганизмов, или могут быть живыми или погибшими клетки (Patti et al., 1994). Живые микроорганизмы биопленок имеют дифференциацию по ряду признаков, которая зависит от места их расположения. Существуют клетки, способные к росту на питательных средах и не дающие такого роста. Бактерии внутри биопленок различаются также по наличию капсул, размеру, подвижности и скорости роста. Для расселения в биопленках образуются специальные плавающие клетки, временно неспособные к размножению. Различаются клетки и по их отношению к действию антимикробных препаратов. В биопленках выявлены группы клеток с особой устойчивостью к антибиотикам, получившие название “персистеры”, находящиеся в состоянии, при котором они невосприимчивы (толерантны) ко всем известным антибиотикам (Harrison et al., 2005; Keren et al., 2004; Lewis, 2007). Бактерии в составе биопленок формируют межклеточные контакты, которые позволяют передавать между клетками некоторые молекулы без их освобождения во внешнюю среду. Такие контакты в числе других факторов способствуют формированию единой кооперативной клеточной системы (Тец, Тец, 2013).

Матрикс биопленок. Основным компонентом биопленок является внеклеточный матрикс (или, как его еще называют, внеклеточная полимерная субстанция (extracellular polymeric substances)), компоненты которого продуцируют образующие сообщество микроорганизмы (Sponza, 2003; Sutherland, 2001).

Клетки в матриксе располагаются определенным образом. По своей структуре он напоминает «губку», т.е. имеет пористую структуру, пропускающую низкомолекулярные соединения, но задерживающую крупные молекулы, белки и частицы среды. В том числе, в структуре биопленки нередко выделяют водные каналы. Через каналы транспортируются питательные вещества и проходят конвективные потоки кислорода от внешних к внутренним частям биопленки, одновременно с этим выводятся метаболиты бактериальных клеток (Moons et al., 2009).

Важнейшей функцией матрикса, помимо каркасной, обеспечивающей стабильность биопленки, является защитная. Доказано, что матрикс защищает бактерии в биопленке от антибактериальных препаратов, а также от неблагоприятных воздействий внешней среды: высыхания, изменения pH, неоптимальной осмотической среды, УФ-облучения, радиации, фагоцитоза, факторов иммунной защиты организма (Flemming, 1993; Gilbert et al., 2007) (таблица 1). ЭПС сорбирует металлы и минералы, растворенные органические вещества, концентрирует ферменты и ростовые факторы. ЭПС матрикса играет важную роль, фиксируя и закрепляя бактерии в тех экологических нишах, где существует угроза смыва. А сложная архитектура биопленок обеспечивает возможность метаболической кооперации клеток внутри пространственно хорошо организованных систем, создает условия, благоприятствующие установлению симбиотических взаимоотношений между бактериями разных видов, передаче сигналов, влияющих на экспрессию генов в популяции бактерий (Хмель, 2014).

Таблица 1 - Свойства и функции внеклеточного полимерного субстрата (EPS) (Смирнова и др., 2010)

Функция ЭПС компонента	Природа ЭПС компонента	Роль в биопленке
Структурные	Нейтральные и кислые полисахариды Амилоиды	Структурный компонент Структурный компонент
Сорбционные	Заряженные или гидрофобные полисахариды	Ионный обмен, сорбция
Активирующие	Внеклеточные ферменты	Деградация полимеров
Поверхностно-активные	Амфифилы Мембранные везикулы	Поверхностные взаимодействия Экспорт из клеток, сорбция
Информативные	Лектины Нуклеиновые кислоты	Специфичность, узнавание Генетическая информация, структура
Питательные	Различные полимеры	Источники С, N, P

Внеклеточный полимерный матрикс состоит из комплекса органических веществ и заполняет всё пространство между микробами. В его составе идентифицированы полисахариды, белки, липиды, внеклеточные ДНК и РНК (Тец, Тец, 2013). Но основным структурным компонентом биопленки является полисахаридный матрикс (Branda et al., 2005) (рисунок 4). На его долю приходится 85 % от всей биопленки. Химический состав матрикса не одинаков у разных систематических групп микроорганизмов (Mohamed, Huang, 2006; Moons et al., 2009; Xavier, et al., 2005). Но как правило, у всех матрикс представляет собой анионный полимер (Смирнова, 2010). Он содержит полисахариды (декстран, гиалуроновую кислоту, целлюлозу, и другие), эта фракция наиболее выражена и составляет от 40 до 95 %. Содержание иных химических

компонентов может сильно варьировать. Так на долю белков может доходить до 60 %, липидов до 40 %, нуклеиновых кислот от 1 до 20 % и эти соединения находятся в гидратированном состоянии, так как 80–90 % объема биопленки занимает вода (Кулишов, Лыков, 2016).

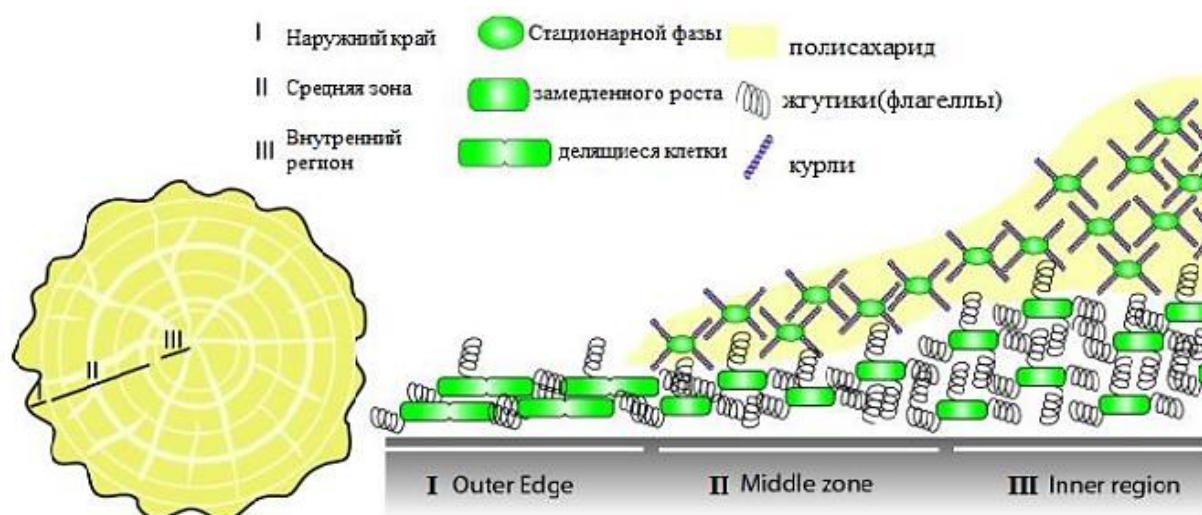


Рисунок 4. Структурная организация биопленки (Hobley et al., 2015)

Структура биопленок идеально способствует процессам обмена генетической информацией за счет тесного контакта и стабильной пространственной локализацией клеток. Исследования *in vitro* выявили, что уровень конъюгации в биопленках гораздо выше, по сравнению с планктонными формами бактерий (Karatan, Signals, 2009). К тому же, процесс конъюгации может регулироваться на популяционном уровне за счет бактериальной коммуникации, например, вирулентные энтерококки для передачи генетической информации используют специальные сигнальные системы (Mohamed, 2007).

Отсюда следует, что биоплёнки включающие дифференцированные клетки бактерий, с гетерогенными микроишами и водными каналами, представляют собой примитивную циркуляторную систему, напоминающую организацию высших организмов, у которых совокупность дифференцированных тканей образует сложный многоклеточный организм (Гостев, Сидоренко, 2010).

1.4. Молекулярные сигналы в формировании биопленок

Такие процессы, как формирование, рост и миграция планктонных форм клеток в биопленках регулируются на уровне популяции посредством механизмов межклеточной коммуникации, называемых «Quorum sensing» (QS) – это процесс коллективной координации экспрессии генов в популяции бактерий, опосредствующий специфическое поведение клеток (Буланцев, Елизаров, 2006; Гостев, Сидоренко, 2010).

Впервые феномен межклеточной коммуникации было обнаружено и описано у симбиотической морской бактерии *Vibrio fischeri* (McDougald et al., 2003; Williams, 2007). Эти бактерии колонизируют специализированный орган моллюсков, ответственный за биолюминесценцию. В опытах *in vitro* отмечено, что популяция, достигая определенной численной плотности, начинает проявлять эффект люминесценции (McDougald et al., 2003).

Механизм работы QS основан на сложной иерархической регуляции целевых локусов генома бактериальной клетки. При этом регуляция осуществляется на разных уровнях воздействия: транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном. На конкретный клеточный сигнал клетки в популяции отвечают специфическим ответом. На сегодняшний день установлено, что клеточно-клеточные взаимосвязи влияют на внутрипопуляционную дифференцировку клеток, на экспрессию генов вирулентности, регулируют ростовые процессы, характер и направление подвижности (таксис), а также бактериальный апоптоз и токсинообразование (Williams, 2007; Гостев, Сидоренко, 2010).

Как оказалось, у бактерий по типу QS – регуляции функционирует широкий спектр физиологических процессов. Именно посредством «эффекта кворума» происходит передача информации следующими путями: непосредственного контакта между клетками, выработки диффундирующих в среде феромоноподобных химических агентов, генерации клетками физических (электромагнитных и иных) полей (Хренов,

Честнова 2013, 2014). Это функционирование связано с синтезом и восприятием аутоиндукторов - сигнальных молекул, диффундирующих из клеток в окружающую среду. Основными компонентами системы кворума являются ферменты, отвечающие за синтез аутоиндукторов, и сенсоры аутоиндукторов, которые регулируют экспрессию кворум-зависимых генов. Функционирует эта система по принципу положительной обратной связи. По мере увеличения концентрации бактериальных клеток происходит накопление аутоиндукторов до пороговой концентрации. Это обеспечивает активацию экспрессии большого набора «кворум-зависимых» генов, в число которых входит и ген синтазы аутоиндукторов. Вследствие этого, интенсифицируется синтез сигнальных молекул, и происходит их лавинообразное накопление в бактериальном микроокружении (Whitehead et al., 2001).

QS регулирует важный процесс переключения фенотипа бактериальной клетки с планктонной формы на сессильную. Это необходимый этап в образовании биопленки для биологически выгодного паразитирования макроорганизма. В самом начале инфекционного процесса первостепенной целью патогена является проникновение и адгезия в тканях макроорганизма, при этом, как отмечалось выше, ресурсы клетки направлены на биосинтез жгутиков и специфических белков - адгезинов. Однако компоненты фимбрий и жгутиков, белки адгезинов являются сильными иммуногенами, они стимулируют также образование интерлейкинов (Гостев, Сидоренко, 2010). Соответственно для дальнейшего выживания популяции внутри инфекционного очага образование жгутиков и систем адгезии будут биологически не выгодными. Поэтому на этапе созревания биопленки QS ингибирует образование жгутиков и адгезинов. Аналогичным образом происходит обратный процесс - образование подвижных форм клеток в биопленке или высвобождение целого кластера клеток (detachment cell) для колонизации окружающего субстрата (Воробьева, 2014).

К настоящему времени накоплено значительное количество информации о том, что способность микроорганизмов к образованию биопленок, как и координация и регуляция жизнедеятельности бактерий внутри биопленки, детерминирована генетически. Исследования показывают, что состав функционирующих генов у планктонных бактерий и бактерий из сообщества биопленки сильно различается. Именно внутри биопленки происходит конъюгация и обмен хромосомным генетическим материалом между бактериями одного вида и даже разными видами. В результате появляются новые генетические клоны бактерий. Это приводит к постоянному обновлению бактериальной популяции и «ускользанию» новых клонов от факторов иммунной защиты организма. Обмен внехромосомной генетической информацией может происходить также с помощью транспозонов или плазмид (Глушанова и др., 2015).

Таким образом, благодаря QS-регуляции, бактерии имеют возможность координировать и контролировать экспрессию тех или иных генов во всем сообществе, а это способствует адаптации всего микробного сообщества в меняющихся условиях среды, что позволяет сохранять свою экологическую нишу и выживать в неблагоприятных окружающих условиях (Кулишов, Лыков, 2016).

1.5. Образование биопленок ризобактериями

Зона почвы, непосредственно окружающая корень растения, где происходят сложные биологические и экологические процессы, называется ризосфера, образует среду, которая удовлетворяет требованиям для формирования биопленок, включая достаточную влажность и запас питательных веществ (Rinaudi, Giordano, 2010).

Многие виды PGPR-бактерий, включая ризобии, образуют микроколонии или биопленки во время колонизации корней растений (Rinaudi, Giordano, 2010). Формирование биопленок *R. leguminosarum* – это комплексный процесс, который требует первоначального прикрепления

отдельных клеток к поверхности корней бобовых растений. Первой фазой прикрепления является обратимое и неспецифическое связывание, в котором участвуют как растительные лектины (Dazzo et al., 1984), так и бактериальные адгезины (Smit et al., 1992), необходимые для агрегации и стабилизации биопленки (Russo et al., 2006). Следующий этап прикрепления требует синтеза бактериальных целлюлозных фибрилл, которые осуществляют тесное и необратимое связывание бактерий на корнях (Dazzo et al., 1984). Переход микроорганизмов в программу роста в составе биопленки, сопровождается значительными изменениями экспрессии десятков генов соответственно стадии развития колонии (Добровольская, 2002), и поэтому с последующим ростом и увеличением числа ризобий, активную роль в формировании биопленок играет синтез экзо- и липополисахаридов, а также Nod - фактора (Цыганова, Цыганов, 2012). На этой стадии микробные клетки формируют микроколонии, которые сливаются, и образуется зрелая биопленка, имеющая сложную трехмерную структуру.

По мере размножения ризобактерий происходит дифференциация клеток, при этом они обмениваются генами и продуктами экспрессии определенных генов, при участии регуляторного механизма - “чувства кворума” (quorum sensing, QS) (Miller, Bassler, 2001; Гинцбург и др., 2003), благодаря которому микробное сообщество действует как единый организм. Именно QS опосредуют клеточную связь в бактериях и координируют общинное поведение путем регулирования конкретных генов в ответ на плотность населения (Rinaudi, Giordano, 2010), что способствует быстрой адаптации популяций ризобий к меняющимся условиям среды и их выживанию в природных условиях (Плюта, 2014), а также стимулирует дальнейшее распределение уже закрепленных в ней бактерий. QS - универсальная стратегия, которой следует большинство растительно-микробных симбиозов (РМС), включает сигнальное взаимодействие растений с микробами, их обмен метаболитами, а также развитие

специализированных для симбиоза клеточных и тканевых структур. Обмен сигналами является процессом, играющим ключевую роль во всех симбиозах и определяющим перекрестную регуляцию и координированную экспрессию генов партнеров (Ellermeier et al., 2006). Высокая зависимость растений от этих взаимодействий отражается насыщенностью их геномов последовательностями ДНК, кодирующими предполагаемые рецепторы для сигналов, получаемых от микросимбионтов (Афиногенова, Даровская, 2011; Габидова, Галынкин, 2017).

Образование биопленок это один из адаптивных механизмов, повышающих устойчивость ризобактерий к действию неблагоприятных факторов (в том числе химических агентов), которые представляют собой совокупность активно метаболизирующих и покоящихся форм клеток, заключенных в экзополимерный матрикс, образованного экзополисахаридами (ЭПС) (Sutherland, 2001), доказано что именно ЭПС имеют большое значение для физиологии микроорганизмов, образующих биопленки (Rudrappa et al., 2008).

Известно, что во время растительно-бактериальных взаимодействий ЭПС участвуют в адгезии бактерий к корням (Michiels et al., 1991), колонизации корней (Matthysse et al., 2005) и, следовательно, служат основным фактором в развитии биопленок на корнях растений (Bianciotto et al., 2001; Ramey et al., 2004; Fujishige et al., 2006). Также ЭПС придают механическую стабильность и архитектуру биопленкам, а также играют важную роль в основных функциях матрикса, в том числе в удержании воды, защите от экологических стрессов, адсорбции соединений и наличии питательных веществ (Flemming, 2010), защиты ризобактериальных клеток от негативных влияний окружающей среды, и проявлении антигенных свойств (Markova et al., 2007), так как именно экзополисахариды вовлечены в процесс подавления реакции защиты растений и синтеза ими противомикробных соединений (Janczarek et al., 2013; Skorupska et al., 2006; Huang et al., 2012). Матрикс биопленки обычно пронизан каналами (Rinaudi,

Giordano, 2010), которые действуют как «система кровообращения», позволяя бактериям обменивать воду, питательные вещества, ферменты и сигналы, утилизировать потенциально токсичные метаболиты и улучшать метаболическую кооперативность (Costerton et al., 1995; Stanley, Lazazzera, 2004).

Развитие биопленочных сообществ способствует повышению вирулентности фитопатогенных бактерий, например, путем блокирования сосудов ксилемы, повышения устойчивости к растительным антимикробным соединениям и/или увеличения конкурентоспособности в конкретных местах обитания (Mansfield et al., 2012). Процессы аутоагглютинации и развитие биопленок способствуют выживаемости бактерий и колонизации макросимбионта. Взаимовлияние этих процессов показано на рисунке 5.

Формирование биопленки, несомненно, является важной особенностью симбиотической способности ризобактерий и объясняет их устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды. Так как именно биопленки являются наиболее распространённой стратегией жизни для бактерий в естественных средах, включая ризосферу (Ильина и др., 2004; Fujishige et al., 2006; Williams et al., 2008), которые функционируют как структуры устойчивые к факторам стресса, таким как засуха, УФ-излучения, хищничество и антибиоз ((Flemming, 1993; Gilbert et al., 1997; Стрелкова и др., 2013).



Рисунок - 5. Связь бактериальной аутоагглютинации и формирования биопленок с колонизацией корней растений (Bogino et al., 2013)

1.6. Бактериальные адгезины

Адгезины – поверхностные компоненты клеток, являются молекулами - посредниками для прикрепления клубеньковых бактерий к корням бобовых растений. У ризобий адгезивными свойствами обладают поверхностные полисахариды клеток и поверхностные белки, такие как рикадгезин, который был найден только у представителей семейства *Rhizobiaceae* (Спайнк, 2002).

Рикадгезины (rhicadhesin) – белки, обладающие двумя обязательными функциональными центрами: для рецептора, локализованного на бактериальной поверхности клетки, и для рецептора на поверхности корневых волосков растений. Было показано, что решающее значение в прикреплении белка играет наличие ионов Ca^{2+} на поверхности бактерий (Smit et al., 1991). На начальной стадии адсорбции бактериальных клеток к корням растений все ризобии используют Ca^{2+} -связывающие рикадгезины (Smit et al., 1987, 1992).

Адгезины могут опосредовать определенный тип адсорбции, например, прикрепление не только к корням, но и к инертным

поверхностям. К таким адгезинам относятся белки адгезии семейства Rap (Rhizobium-adhering proteins), выделенные из *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Ausmees et al., 2001). Они содержат один или несколько так называемых «RA» (rhizobium-adhering), которые имеют высокую степень гомологии и состоят из 100-120 аминокислот. Известно несколько белков данного семейства: RapA, RapB и RapC. RapA белок имеет два RA домена и две изоформы, называемые RapA1 и RapA2. RapA1 имеет сходство с рикадгезином, так как он также может связывать Ca^{2+} и участвовать в адсорбции бактерий к поверхности корневых волосков растений, но, тем не менее, отличается некоторыми биохимическими свойствами и имеет размер 24 кДа вместо 14 кДа. Кроме того, RapA1 является производным только небольшой группы ризобий (Ausmees et al., 2001). С помощью RapA1-антител данный белок был обнаружен только у близкородственных штаммов и видов: *R. leguminosarum* bvs. *trifolii*, *viciae*, *phaseoli* и *R. etli*, а не у всех представителей рода *Rhizobium* (Ausmees et al., 2001). В естественных условиях внеклеточный Ca^{2+} -связывающий RapA1 - белок, распознает полисахарид на бактериальной поверхности и способствует ризобияльной аутоагглютинации через клеточные полюса (Mongiardini et al., 2008).

Таким образом, рецепторы для связывания RapA1 белков имеют только определенные штаммы ризобий (Ausmees et al., 2001) и использование белка RapA1 в качестве инструмента для создания различных симбиотических систем между клубеньковыми бактериями и растениями производится с целью улучшения колонизации корневой системы ризобиями (Хакимова, 2017), так как доказано, что повышенная конститутивная экспрессия гена *rapA1* влияет на конкурентоспособность штаммов ризобий *R. leguminosarum* и увеличивает адсорбционную способность их клеток к корневым волоскам растений (Mongiardini et al., 2008, 2009).

1.7. Гены модификаторы механизмов формирования биопленок

Кроме бактериальных адгезинов на начальных этапах прикрепления участвуют и бактериальные поверхностные экзополисахариды (ЭПС). Накопленные данные свидетельствуют о том, что ЭПС играют важную роль в процессах адаптации и прикрепления бактерий, защиты ризобийных клеток от негативных влияний окружающей среды (Markova et al., 2007), а также придают механическую стабильность и архитектуру биопленкам (Flemming, 2010).

Биосинтез ЭПС у ризобий, происходит в 3 этапа: синтез повторяющихся олигосахаридных звеньев, их модификация и полимеризация, а также транслокация на поверхность клетки. ЭПС синтезированный *R. leguminosarum*, представляет собой полимер, состоящий из октасахаридных повторяющихся единиц, содержащих D-глюкозу, D-глюкуроновую кислоту и D-галактозу в молярном соотношении 5:2:1. Этот октасахарид модифицируется двумя остатками ацетала пировиноградной кислоты, O-ацетильными и гидроксibuтаноильными группами (Downie, 2010). Сборка повторяющихся звеньев иницируются путем переноса глюкозо-1-фосфата с UDP-глюкозы на носитель C₅₅-изопренилфосфата (IP), который расположен на внутренней мембране. Эта стадия синтеза ЭПС обеспечивается глюкозил-IP-трансферазой, кодируемой консервативным геном *pssA* (Janczarek et al., 2001)

Ген *pssA* не связан с другими генами синтеза ЭПС и представлен отдельной открытой рамкой считывания (ORF) (Janczarek et al., 2001; Лавина и др., 2017). Однако все еще мало известно о регуляции экспрессии генов *pssA* в ответ на сигналы окружающей среды. Один из таких регуляторных генов *rosR*, который кодирует транскрипционный регулятор, участвующий в биосинтезе ЭПС. RosR представляет собой белок массой 15,7 кДа. С-конец белка представлен мотивом цинкового пальца типа C₂H₂, который связывается с последовательностью в 2-п.н., называемой RosR box.

Было показано, что RosR распознает и связывается с мотивом RosR box, расположенным до *rosR* и, в следствии, отрицательно регулирует транскрипцию гена. На экспрессию *rosR* влияют такие факторы окружающей среды, как источники углерода, фосфатов и флавоноиды. Те же внешние факторы влияют на уровень производства ЭПС в *R. leguminosarum* (Janczarek, Skorupska, 2011; Лавина и др., 2017)

Таким образом, так как ЭПС играют решающую роль в симбиотических взаимодействиях клубеньковых бактерий с бобовыми растениями, регуляция биосинтеза ЭПС очень важна для выполнения биологических функций этого полимера в симбиозе.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В рамках работы по проведению изучения микроскопических структур биопленок, в качестве объектов исследования использовались штаммы бактерий из рабочей коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: *R.leguminosarum* PVu5, *R.leguminosarum* THy2, *R.leguminosarum* TPr4, *R.leguminosarum* VSy12, *R.galegae* 0702 дикого типа и рекомбинантные по генам: *pssA*, *rosR* (гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов) и *rapA1* (ген, ответственный за агглютинацию бактерий). В таблице 2 рассмотрен список диких штаммов и их растение – хозяин.

Таблица 2 – Список диких штаммов ризобактерий и их растение - хозяин

№п\п	Название штамма в коллекции ИБГ УФИЦ РАН	Растение - хозяин, исследуемого штамма
1	<i>R. leguminosarum</i> PVu5	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
2	<i>R. leguminosarum</i> THy2	Клевер розовый (<i>Trifolium hybridum</i>)
3	<i>R. leguminosarum</i> TPr4	Клевер луговой (<i>Trifolium pratense</i>)
4	<i>R. leguminosarum</i> VSy12	Горошек лесной (<i>Vicia sylvatica</i>)
5	<i>R. galegae</i> 0702	Козлятник восточный (<i>Galega orientalis</i>)

Список штаммов с измененной экспрессией генов модификаторов механизмов инициации и формирования биопленок на инертных поверхностях:

Ризобиальные штаммы, рекомбинантные по гену *rapA1*:

- *R. leguminosarum* Pvu 5 + *RapA1*
- *R. leguminosarum* VSy12 (2008) + *RapA1*
- *R. leguminosarum* THy2+ *RapA1*
- *R. leguminosarum* TPr4 (2004) + *RapA1*
- *R. galegae* 0702+ *RapA1*

Ризобиальные штаммы, рекомбинантные по гену *pssA*:

- *R. leguminosarum* PVu5 *PssA*
- *R. leguminosarum* THy2 *PssA*
- *R. leguminosarum* TPr4 *PssA*
- *R. leguminosarum* VSy12 *PssA*
- *R. galegae* 0702 *PssA*

Ризобиальные штаммы, рекомбинантные по гену *rosR*:

- *R. leguminosarum* PVu5 *RosR*
- *R. leguminosarum* THy2 *RosR*
- *R. leguminosarum* TPr4 *RosR*
- *R. leguminosarum* VSy12 *RosR*
- *R. galegae* 0702 *RosR*

Методы исследования

2.2. Питательные среды и условия культивирования

Для культивирования ризобактерий использовали маннитно-дрожжевую среду (NJYM-среда), состав приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав жидкой маннитно-дрожжевой питательной среды на 100 мл

Компонент	Концентрация
Дрожжевой экстракт (0,5%)	0, 5 г
Маннитол (1%)	1 г
MgSO ₄ (0,01%)	1 мл
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (0,05%)	1 мл
CaCO ₃ (0,03%)	30 мкл

В зависимости от заданной задачи использовали стеклянные колбы или 96-луночный полистироловый планшет с крышкой. Культивирование проводилось в аэробных условиях с использованием специального аппарата - шейкера-инкубатора ES-20, предназначенный для культивирования клеток по заданной программе: при температуре 28°C и скорости 140 об./мин.

2.3. Микроскопические исследования структур биопленок

Микроскопическое исследование проводили с использованием оптического микроскопа модели BZ-8100 (Biozero).

Биопленки, которые образуют штаммы на инертных поверхностях, исследовали с применением с применением 96-луночных пластиковых планшетов.

Для этого жидкую культуру ризобактерий выращивали в течении 2-х суток в стеклянных колбах в жидкой среде YM в шейкере при 28°C и 140 об./мин. до концентрации 10⁸ КОЕ/мл. Затем пипеткой отбирали 10 мкл. жидкой культуры, разбавляли 1:10 в свежей среде YM и помещали в одну из лунок 96-луночного пластикового планшета (полистерол). Планшеты герметизировали парафильмом и инкубировали в шейкере при 28°C и 140 об./мин. в течение 7 суток. После инкубации с помощью пипетки удаляли питательную среду и планктонные клетки, и биопленки окрашивали по методу Грама.

2.4. Окрашивание по методу Грама

Для микроскопического исследования микроорганизмов, использовали универсальный способ сложной окраски по методу Грама.

Техника окрашивания по Граму:

1. На препарат наливают раствор генцианвиолета, окрашивание производится в течение 1-2 минут.
2. Сливают краску и, не промывая препарата водой, на 1 минуту, до полного почернения препарата, наливают на него раствор Люголя.
3. Раствор сливают, препарат прополаскивают 96° спиртом в течение 20-30 секунд. Обесцвечивание производят до отхождения фиолетовых струй краски.
4. Спирт тщательно смывают водой.
5. Препарат докрашивают разведенным фуксином в течение 30-60 секунд. Краску смывают водой, препарат высушивают и микроскопируют.

Микроскопическая картина: при правильной окраске мазков по Граму грамположительные микробы будут окрашены в темно-фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в розовый, в цвет фуксина Пфейффера.

2.5. Оценка зависимости числа живых клеток от времени и построение кривой роста микроорганизмов

Определение оптической плотности проводили с использованием сканирующего настольного спектрофотометра SmartSpec Plus.

Для оценки зависимости логарифма числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде, мы проводили измерения количества клеток, необходимые для описания лаг-фазы, экспоненциальной фазы и стационарной фазы роста с построением кривой роста и размножения, представленной в виде логарифма.

Для определения количества клеток, исследуемые ризобактерии выращивали в жидкой среде УМ в стеклянных колбах на шейкере при 28°C

и 140 об./мин. в течение 1, 4, 16, 24 и 48 часов. Измерения прекращали после 48 часов инкубирования, в виду того что после 2-х суток у ризобий продолжается стационарная фаза, за которой следует фаза отмирания клеток.

Для построения кривой роста микроорганизмов вычислялись основные параметры роста микроорганизмов:

X - концентрация биомассы, кл/мл*10⁷;

N - число клеток в единице объема (титр культуры, плотность популяции), количество клеток в 3 мл;

μ - удельная скорость роста – прирост биомассы или числа клеток в единицу времени, отнесенный к концентрации биомассы или количеству клеток, ч⁻¹:

$$\mu = \frac{dX}{dt} \frac{1}{X}; \quad \mu = \frac{dN}{dt} \frac{1}{N};$$

t_d время генерации, время удвоения биомассы или числа клеток, ч:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu};$$

Y - экономический коэффициент (или выход биомассы от потребленного субстрата), %:

$$Y = \frac{\Delta X}{\Delta S} \cdot 100,$$

где ΔX - увеличение биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве ΔS .

По мере получения данных строится график – кривая роста (рисунок 6), определялась продолжительность логарифмической кривой и рассчитывался количество биомассы от заданного субстрата при определенном времени эксперимента.

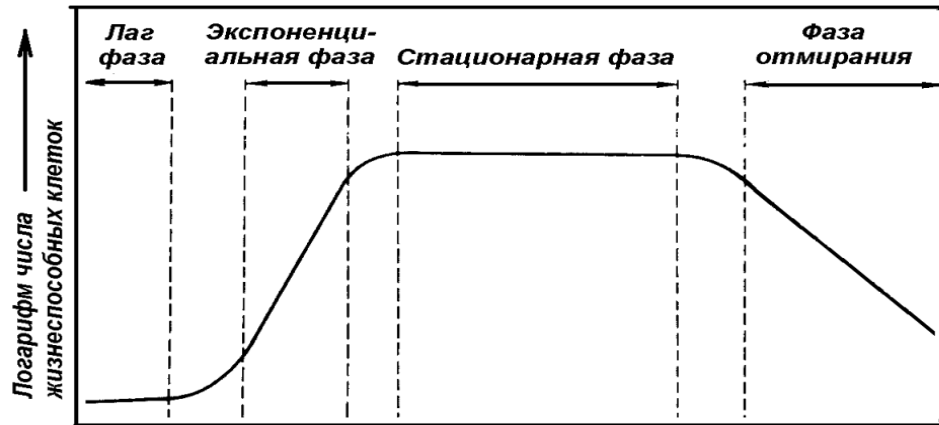


Рисунок 6 - Основные фазы кривой роста периодической культуры микроорганизмов

Результаты обрабатывали с использованием стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2013.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Проведение детальных микроскопических исследований структур, образуемых дикими и рекомбинантными по генам регуляции синтеза экзополисахаридов *pssA*, *rosR* и адгезина *rapA1*, штаммами бактерий рода *Rhizobium*

Бактерии *R. leguminosarum* и *R. galegae* образуют биопленки на стерильных инертных поверхностях, в том числе и на полистироле. В виду этого были проведены микроскопические исследования структур, образованных исследуемыми ризобияльными штаммами дикого типа и ризобиями с измененной экспрессией генов: *pssA* и *rosR* (гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов), а также с геном *rapA1* (ответственным за агглютинацию бактерий).

Микроскопическое исследование структуры биопленок, образуемых диким и рекомбинантными штаммами бактерий *Rhizobium leguminosarum* PVu5

При исследовании биопленки, образованной диким штаммом *R. leguminosarum* PVu5 за 7 суток мы наблюдали единичные клетки, расположенные в виде отдельных бактериальных клеток друг от друга (рисунок 7). Это может указывать на незрелость биопленки и возможное продолжение ее развития, так как произошла адгезия единичных клеток на поверхности полистироловой лунки – один из начальных этапов формирования биопленок.

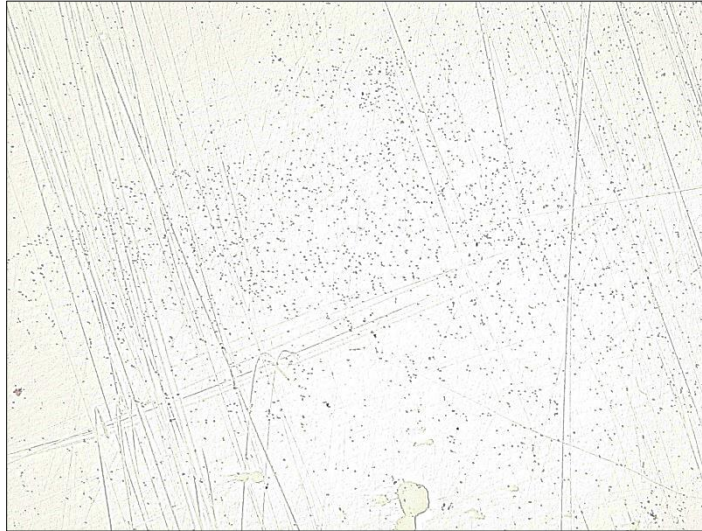


Рисунок 7 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* PVu5 за 7 суток

Рекомбинантный штамм *R. leguminosarum* PVu5 *rap* образовал более сложную структуру биопленки, так как здесь мы уже наблюдали упорядоченное расположение бактерий в виде отдельных ветвистых структур или цепочек из нескольких бактериальных клеток (рисунок 8). Это говорит о том, что микроколонии начали сливаться, с последующим образованием зрелой биопленки.



Рисунок 8 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* PVu5 *Rap* за 7 суток

На препарате биопленки, образованной рекомбинантным штаммом *R. leguminosarum* PVu5 *pssA* наблюдалось большое количество единичных

клеток (рисунок 9). Это может указывать на то что уже произошла адгезия и клетки после необратимой фиксации начали делиться.

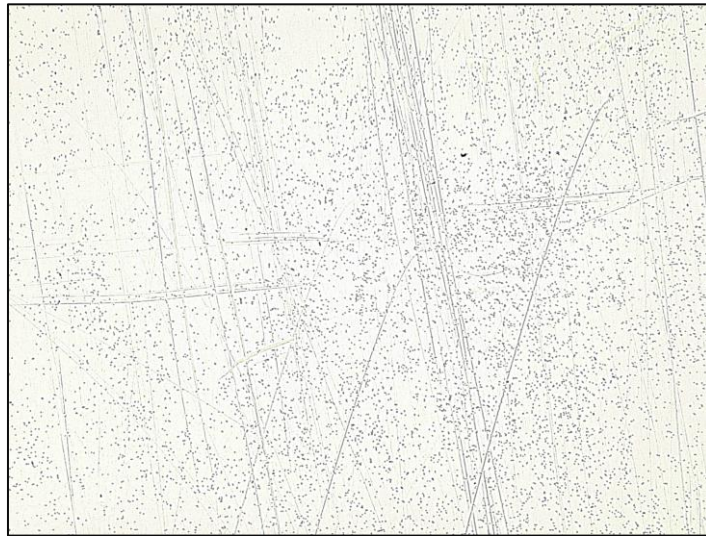


Рисунок 9 - Био пленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* PVu5 PssA за 7 суток

Био пленка, образованная рекомбинантным штаммом *R. leguminosarum* PVu5 *rosR* имела более сложную структуру, даже можно сказать что био пленка формировала микро колонии - отдельные скопления адгезированных клеток, так как на препарате имеется очень большое количество клеток в виде ветвистых структур, которые начинают формировать тяжи (рисунок 10).

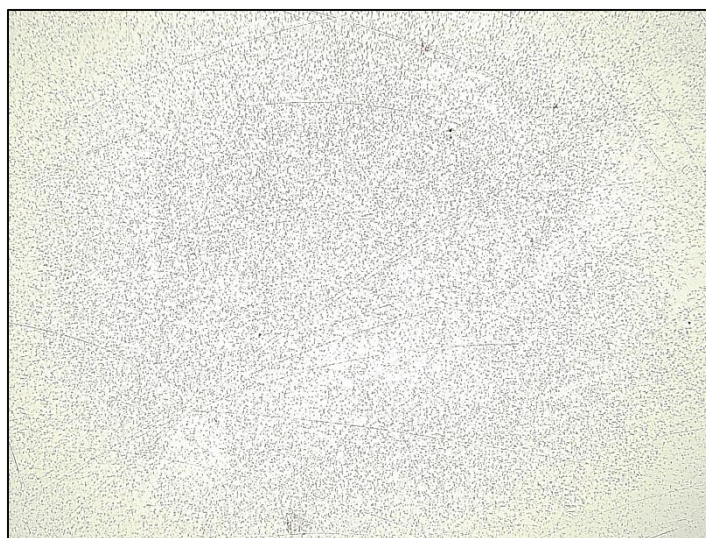


Рисунок 10 - Био пленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* PVu5 RosR за 7 суток

**Микроскопическое исследование структуры биопленок,
образуемых диким и рекомбинантными штаммами бактерий
Rhizobium leguminosarum THy2**

При микроскопировании биопленки дикого штамма *R. leguminosarum* THy2 мы наблюдали уплотненные участки биопленки, в которой отмечено большое скопление клеток (рисунок 11). Можно предположить, что ризобии формируют микроколонии с последующим созреванием биоплёнки.

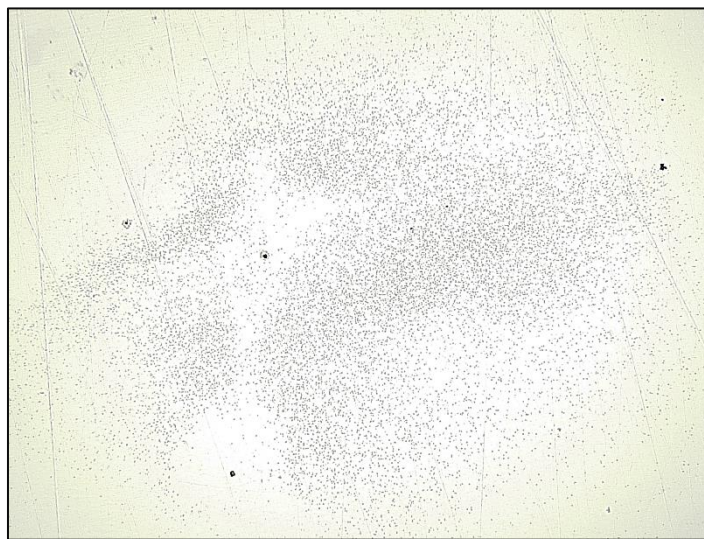


Рисунок 11 - Биопленка, образованная штаммом
R. leguminosarum THy2 за 7 суток

Биопленка, образованная рекомбинантным штаммом *R. leguminosarum* THy2 *rap* достигла стадии полного созревания, так как сформировано большое количество микроколоний, которые сливаются с образованием тяжей (рисунок 12).

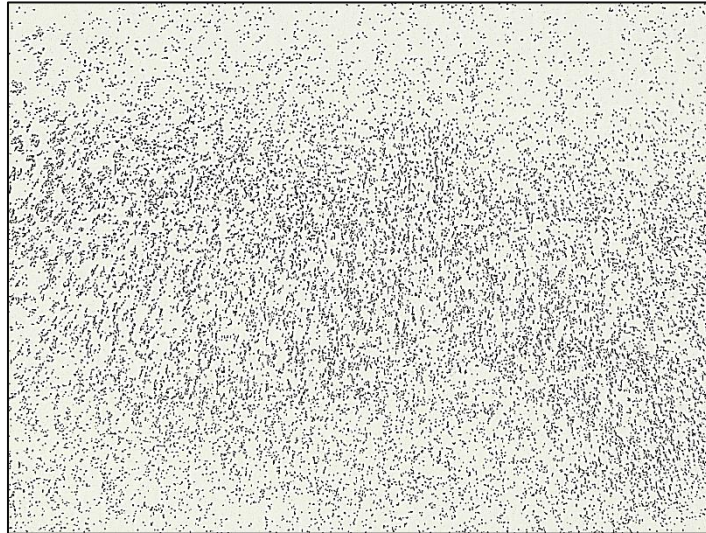


Рисунок 12 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* THy2 *Rap* за 7 суток

При исследовании биопленки, образованной рекомбинантным штаммом *R. leguminosarum* THy2 *pssA*, было обнаружено большое количество единичных клеток, необратимо прикрепленных к поверхности - начальной стадии формирования биопленки (рисунок 13).

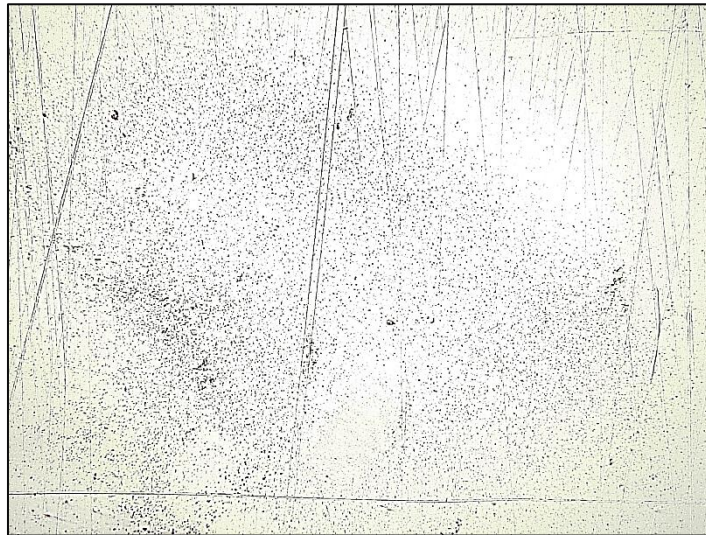


Рисунок 13 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* THy2 *PssA* за 7 суток

Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* THy2 *rosR* за 7 суток, имела также большое количество единичных клеток, с образованием уплотнений (рисунок 14). Заметно, что биопленка претерпевает процесс деления, то есть происходит процесс созревания биоплёнки.

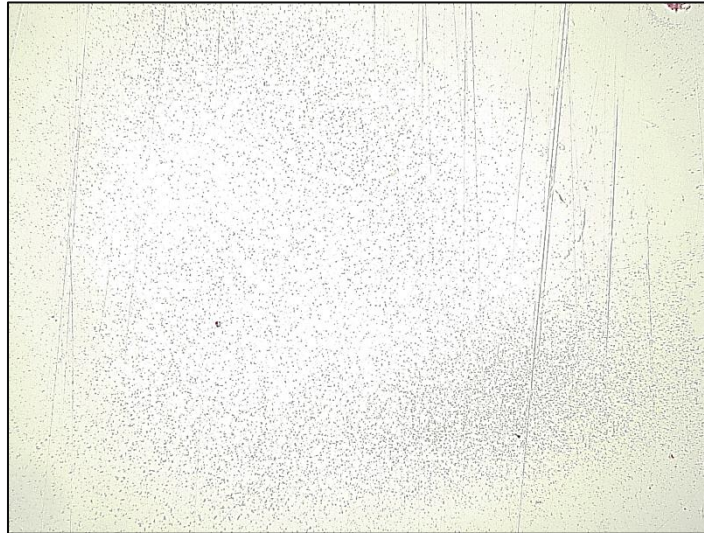


Рисунок 14 - Биопленка, образованная штаммом
R. leguminosarum THy2 RosR за 7 суток

**Микроскопическое исследование структуры биопленок,
образуемых диким и рекомбинантными штаммами бактерий
Rhizobium leguminosarum TPr4**

При микроскопировании биопленка, формируемая штаммом *R. leguminosarum* TPr4 дикого типа, находилась на более старшей стадии развития, так как уже сформированы микроколонии, расположенные в виде большого количества ветвистых структур (рисунок 15). Можно предположить, что эта биопленка переходит в стадию роста.

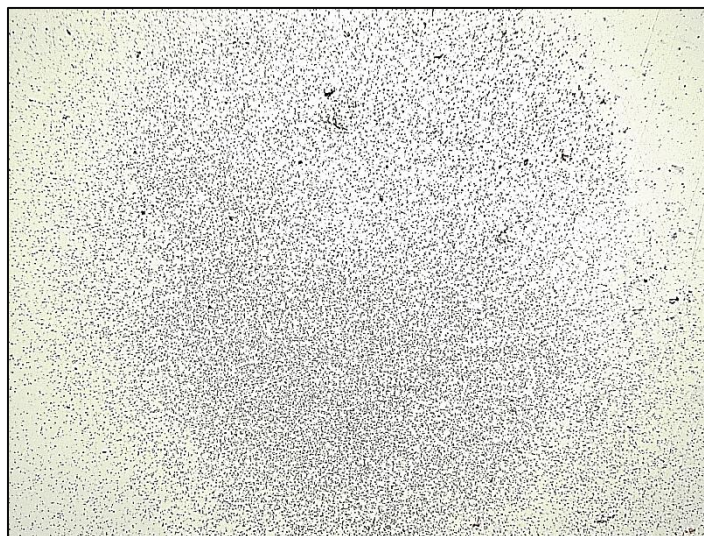


Рисунок 15 - Биопленка, образованная штаммом
R. leguminosarum TPr4 за 7 суток

Самая зрелая и самая сложная структура биопленки наблюдалась только у рекомбинантного штамма *R. leguminosarum* TPr4 rap, так как именно она характеризуется самыми четкими соединяющимися между собой «тяжами паутины» (рисунок 16). Которые представляют собой погруженные в матрикс конгломераты клеток, варьирующие по плотности, создавая открытые области, являющиеся, вероятно всего, водными каналами.

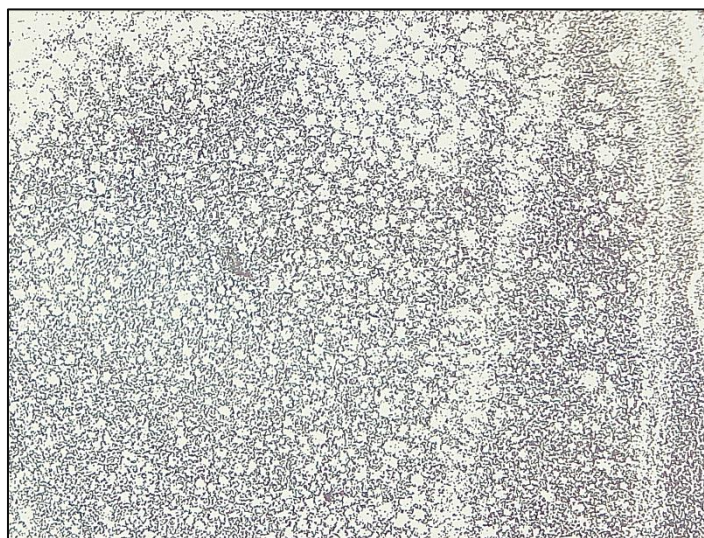


Рисунок 16 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* TPr4 Rap за 7 суток

При микроскопировании биопленок как у рекомбинантного штамма *R. leguminosarum* TPr4 pssA, так и *R. leguminosarum* TPr4 rosR выявлено большое количество поделившихся единичных клеток, которые начинают образовывать скопления в виде отдельных ветвистых структур и уплотнения из нескольких бактериальных клеток (рисунок 17-18).

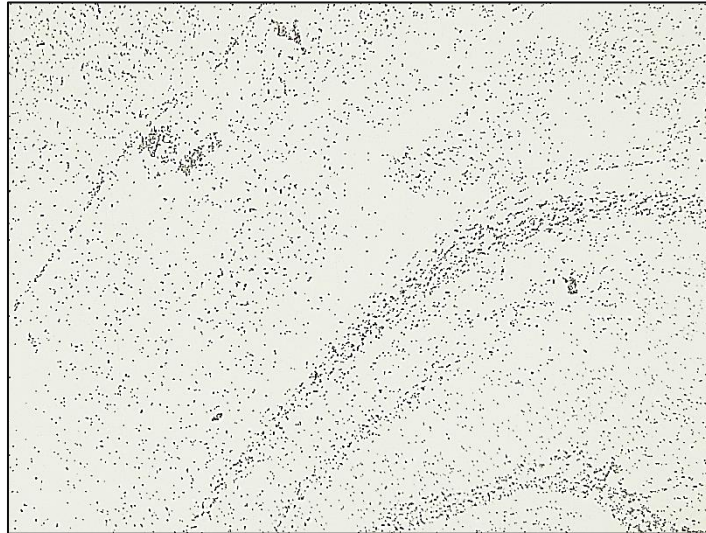


Рисунок 17 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* TPr4 PssA за 7 суток

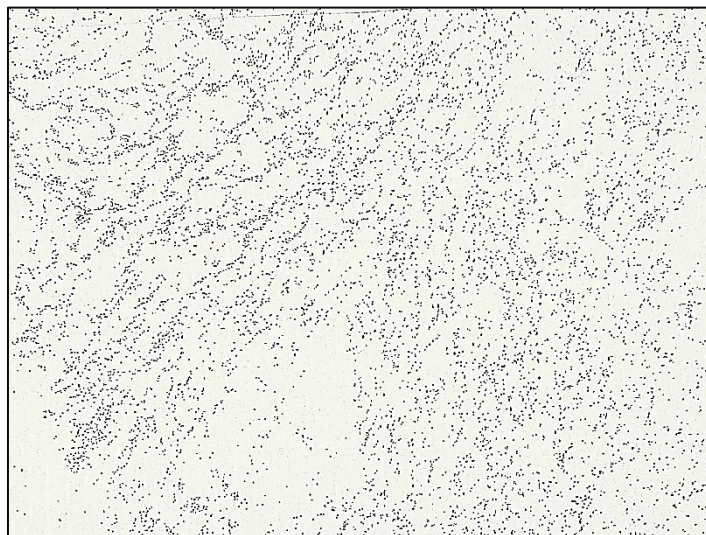


Рисунок 18 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* TPr4 RosR за 7 суток

**Микроскопическое исследование структуры биопленок,
образуемых диким и рекомбинантными штаммами бактерий
Rhizobium leguminosarum VSy12**

При микроскопировании дикого штамма *R. leguminosarum* VSy12 встречалось самое большое количество единичных клеток (рисунок 19), возможно это связано с тем, что для образования зрелой биопленки штамму *R. leguminosarum* VSy12 необходимо больше времени.



Рисунок 19 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* VSy12 за 7 суток

Биопленка, образованная рекомбинантным штаммом *R. leguminosarum* VSy12 rap, характеризовалась большим скоплением единичных клеток, и можно даже сказать, что биопленка находится в стадии созревания, так как похоже, что клетки претерпевают процесс деления с последующим формированием микроколоний (рисунок 20).

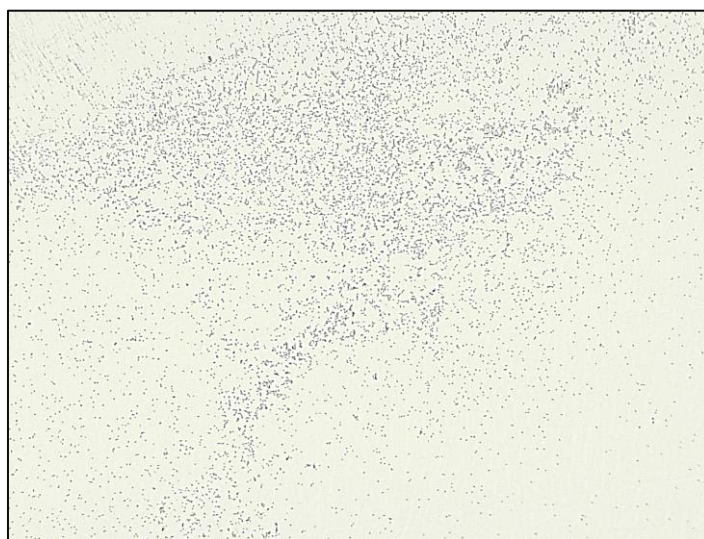


Рисунок 20 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* VSy12 Rap за 7 суток

Самая зрелая биопленка среди рекомбинантных штаммов *R. leguminosarum* VSy12 была у *R. leguminosarum* VSy12 pssA. На препарате биопленки, адгезия отдельных бактериальных клеток ризобий происходит с последующим формированием длинных нитей и коротких цепочек, которые

как раз и образуют зрелую биопленку (рисунок 21).

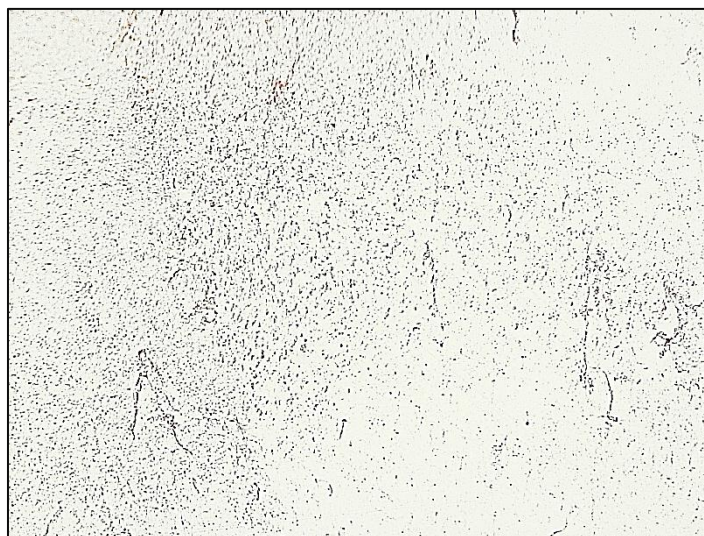


Рисунок 21 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* VSy12 PssA за 7 суток

На препарате биопленки, образованная штаммом *R. leguminosarum* VSy12 *rosR* выявлено большое количество единичных клеток (рисунок 22), что может также говорить о том, что для образования зрелой биопленки штамму *R. leguminosarum* VSy12 *rosR* необходимо больше времени.

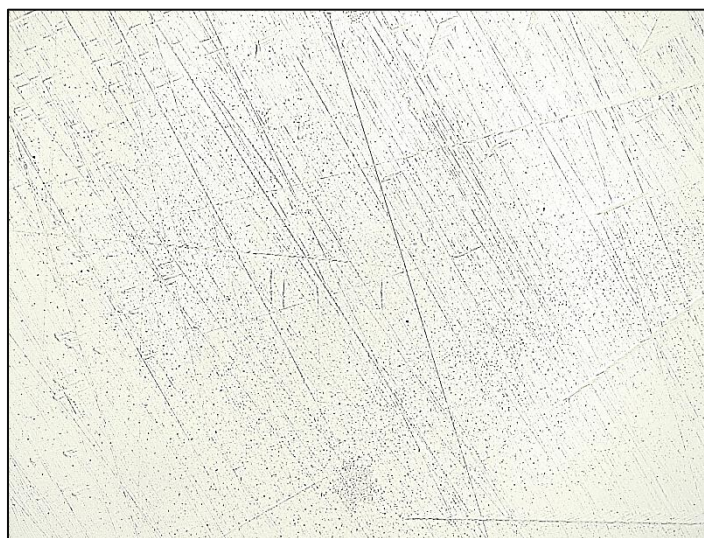


Рисунок 22 - Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* VSy12 RosR за 7 суток

**Микроскопическое исследование структуры биопленок,
образуемых диким и рекомбинантными штаммами бактерий
Rhizobium galegae 0702**

При микроскопировании биопленки, образованной диким штаммом *R. galegae* 0702 замечено большое количество единичных клеток и небольшие скопления их, где микроколонии формируются в виде уплотнений (рисунок 23), что говорит о том, что биопленка находится на стадии роста.

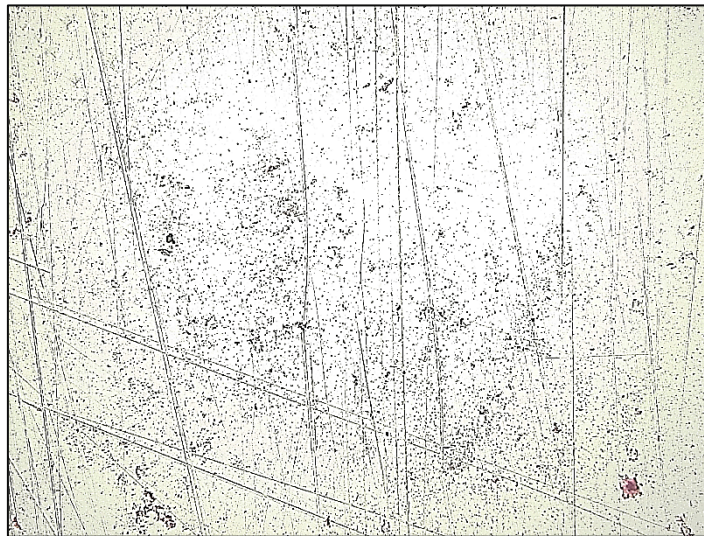


Рисунок 23 - Биопленка, образованная штаммом
R. galegae 0702 за 7 суток

На препарате биопленки, образованной рекомбинантным штаммом *R. galegae* 0702 *rap* сформированы небольшие скопления единичных клеток в микроколонии (рисунок 24), следовательно, можно сказать что образуется зрелая биопленка, которая претерпевает стадию роста, где она изменяет свой размер и форму.

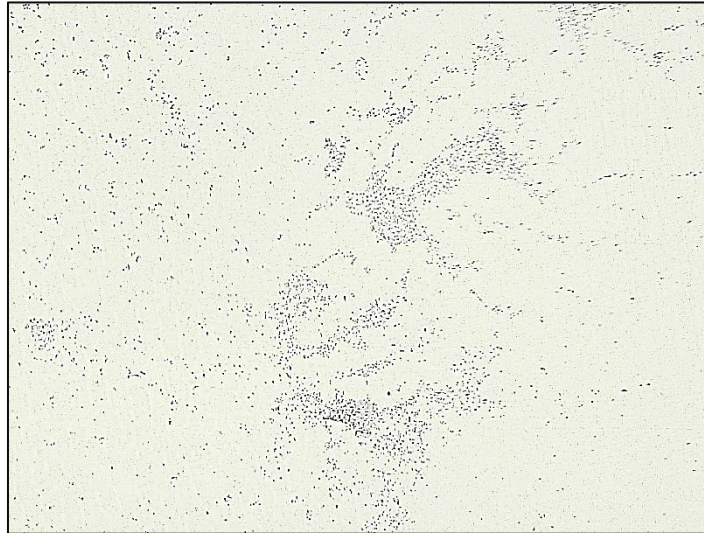


Рисунок 24 - Биопленка, образованная штаммом *R. galegae* 0702 *Rap* за 7 суток

При исследовании биопленок, образованных штаммами *R. galegae* 0702 *pssA* и *R. galegae* 0702 *rosR* выявлены самые зрелые биопленки более сложной архитектуры по сравнению с диким видом и рекомбинантным штаммом *R. galegae* 0702 *rap*. Эти биопленки обуславливаются очень большим количеством и в виде отдельных ветвистых структур, и в виде цепочек состоящих, из нескольких бактериальных клеток (рисунок 25-26). Несмотря на то, что гены *pssA* и *rosR* участвуют в биосинтезе экзополисахаридов у штаммов вида *R. leguminosarum*, это указывает на то, что данные гены могут работать и у родственных штаммов с положительным влиянием на их биопленкообразование и выживаемость в целом.



Рисунок 25 - Биопленка, образованная штаммом *R. galegae* 0702 *PssA* за 7 суток

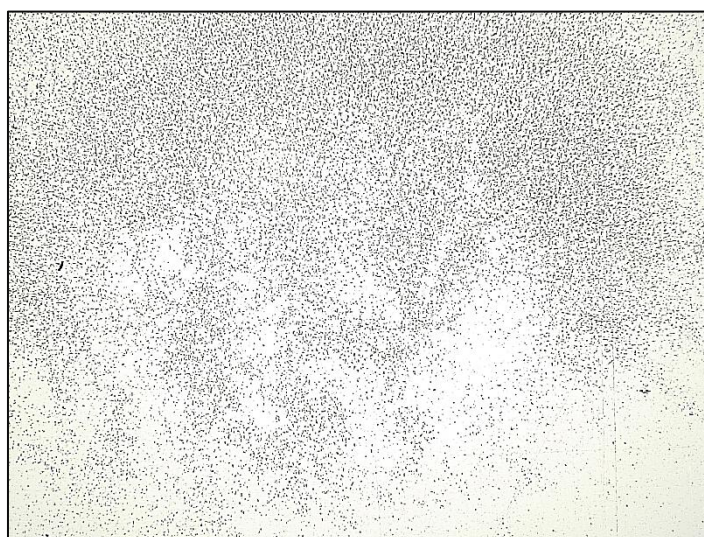


Рисунок 26 - Биопленка, образованная штаммом *R. galegae* 0702 *RosR* за 7 суток

3.2. Оценка зависимости логарифма числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде диких и рекомбинантных штаммов бактерий рода *Rhizobium*

Оценка числа живых клеток от времени, диких и рекомбинантных штаммов бактерий *Rhizobium leguminosarum* PVu5

В случае разновидностей штамма *R. leguminosarum* PVu5 мы выяснили, что рост клеток рекомбинантных штаммов происходит

интенсивнее по сравнению с диким штаммом. Так как наибольшее количество клеток мы наблюдали в случае измерения у штаммов *R. leguminosarum* PVu5 *rapA1* и *R. leguminosarum* PVu5 *rosR* (рисунок 27).

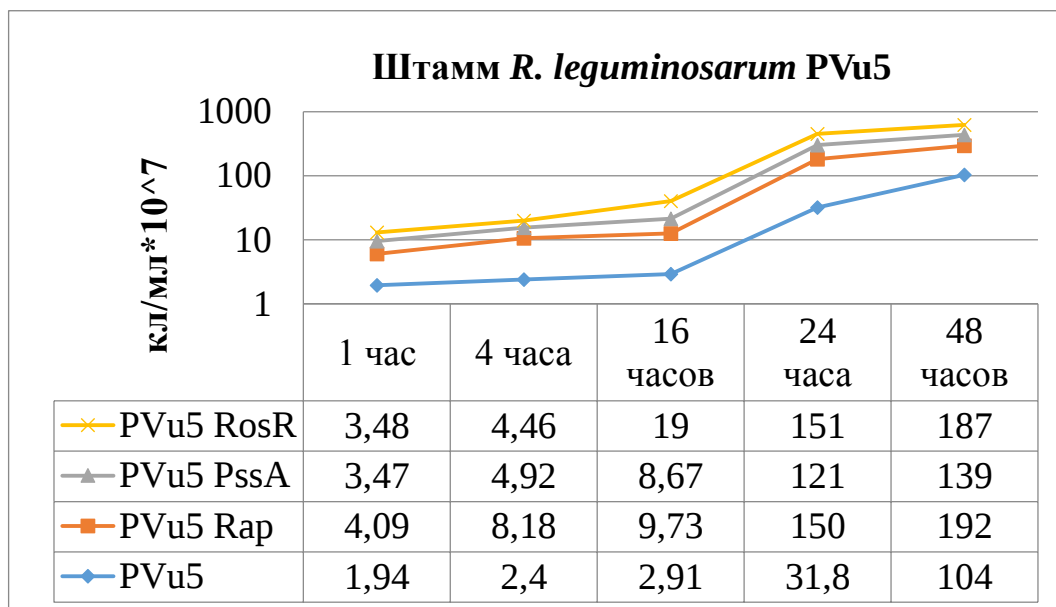


Рисунок 27 - Кривая роста и размножения штаммов *R.leguminosarum* PVu5 (дикий тип), *R.leguminosarum* PVu5 *rapA1*, *R.leguminosarum* PVu5 *pssA*, *R.leguminosarum* PVu5 *rosR*, представленная в виде логарифма

Оценка числа живых клеток от времени, диких и рекомбинантных штаммов бактерий *Rhizobium leguminosarum* THy2

У штамма *R. leguminosarum* THy2 *rapA1* после 2-х суточных измерений показатель количества клеток был незначительно ниже штамма дикого типа и сильно отставал от показателей штаммов *R. leguminosarum* THy2 *pssA* и *rosR*. Однако рекомбинантные штаммы *R. leguminosarum* THy2 *pssA* и *R. leguminosarum* THy2 *rosR* показали схожие результаты прироста клеток (рисунок 28).

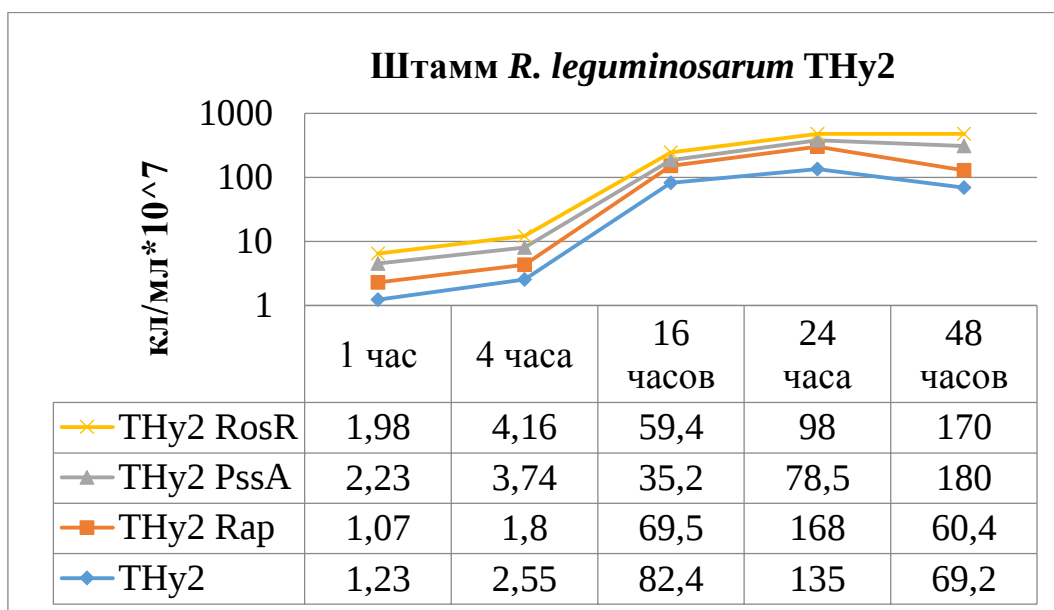


Рисунок 28 - Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* THy2 (дикий тип), *R. leguminosarum* THy2 rapA1, *R. leguminosarum* THy2 pssA, *R. leguminosarum* THy2 rosR, представленная в виде логарифма

Оценка числа живых клеток от времени, диких и рекомбинантных штаммов бактерий *Rhizobium leguminosarum* TPr4

Значения измерений количества клеток рекомбинантных разновидностей штамма *R. leguminosarum* TPr4 было примерно одинаковым и оказалось значительно выше штамма дикого типа. Однако, несмотря на это наиболее быстрый рост клеток показал штамм *R. leguminosarum* TPr4 rapA1 (рисунок 29).

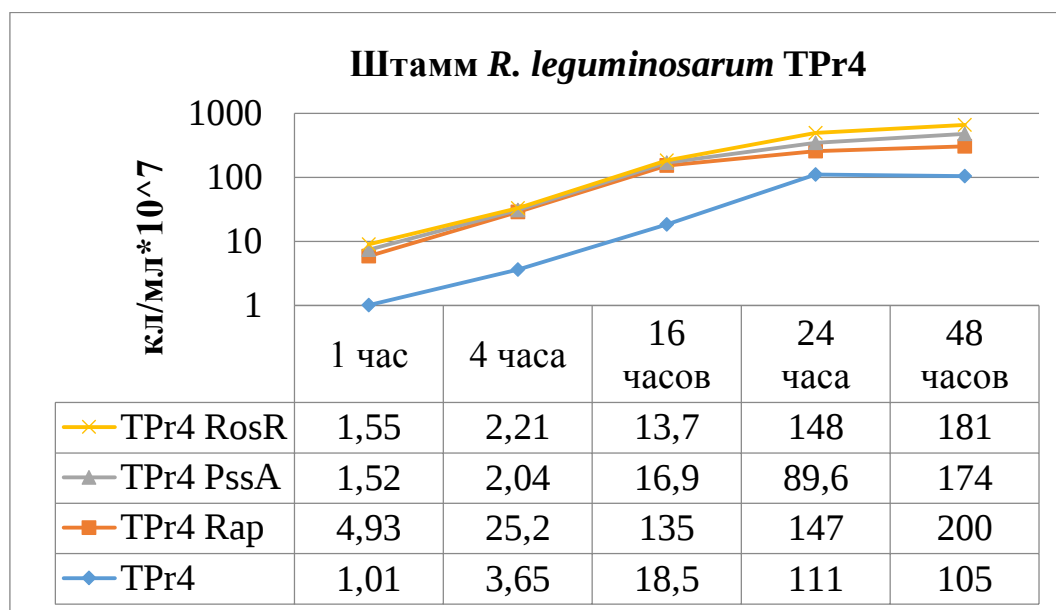


Рисунок 29 - Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* TPr4 (дикий тип), *R. leguminosarum* TPr4 *rapA1*, *R. leguminosarum* TPr4 *pssA*, *R. leguminosarum* TPr4 *rosR*, представленная в виде логарифма

Оценка числа живых клеток от времени, диких и рекомбинантных штаммов бактерий *Rhizobium leguminosarum* VSy12

Проанализировав значения разновидностей штамма *R. leguminosarum* VSy12, оказалось, что показатели штамма дикого типа в лаг-фазе, экспоненциальной фазе и фазе стационарного роста оказались выше некоторых показателей рекомбинантных штаммов. А самое наименьшее количество клеток в стационарной фазе выявлено у рекомбинантного штамма *R. leguminosarum* VSy12 *rapA1* (рисунок 30).

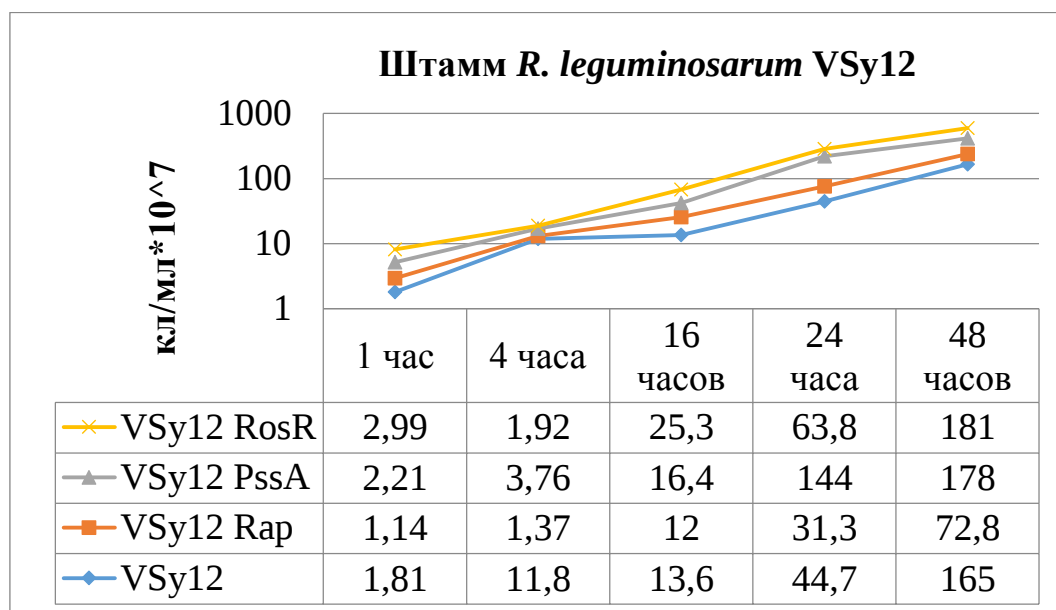


Рисунок 30 - Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* VSy12 (дикий тип), *R. leguminosarum* VSy12 rapA1, *R. leguminosarum* VSy12 pssA, *R. leguminosarum* VSy12 rosR, представленная в виде логарифма

Оценка числа живых клеток от времени, диких и рекомбинантных штаммов бактерий *Rhizobium galegae* 0702

При оценке значений только у разновидностей штамма *R. galegae* 0702 отмечился очень быстрый рост клеток, на этом сказались наивысшие средние показатели числа живых клеток от времени, как у штамма дикого типа, так и у рекомбинантных штаммов (рисунок 31). Однако по истечению 2 суток, только у рекомбинантных штаммов *R. galegae* VSy12 pssA и *R. galegae* rosR количество клеток только увеличилось, а у штаммов *R. galegae* и *R. galegae* rapA1 количество клеток стало уменьшаться.

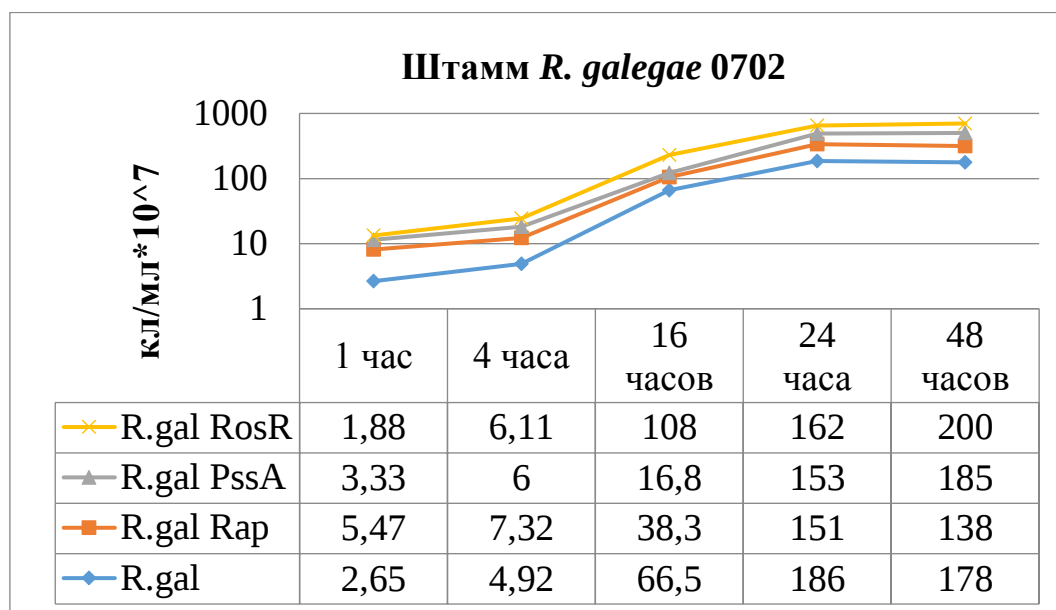


Рисунок 31 - Кривая роста и размножения штаммов *R. galegae* 0702 (дикий тип), *R. galegae* 0702 *rapA1*, *R. galegae* 0702 *VSy12 pssA*, *R. galegae* 0702 *rosR*, представленная в виде логарифма

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день бактериальные биопленки остаются одним из наиболее интенсивно исследуемых объектов, более того, анализ доступных литературных данных наглядно демонстрирует значимость и актуальность проблемы образования биопленок в развитии воспалительных процессов различных органов и систем, а также в формировании катетер-ассоциированных инфекций кровотока.

На современном этапе развития микробиологии проводятся всевозможные исследования микроорганизмов, существующих в биопленке, как с целью предупреждения распространения заболеваний, так и для лечения уже существующих инфекций, ассоциированных с биопленками. Однако для активного поиска средств борьбы с биоплёнками, прежде всего необходимо понимание феномена биопленки. Этому может поспособствовать большое количество методов: от измерения оптической плотности до различных вариантов световой и электронной микроскопии.

В нашей работе изучено микроскопическое исследование структуры биопленок с использованием световой микроскопии с применением методики окрашивания по Граму. Также нами была проведена оценка зависимости числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде, в течение 1, 4, 16, 24 и 48 часов, с построением кривой роста и размножения, представленной в виде логарифма. Еще одним важным аспектом в нашем исследовании являлось изучение биопленок штаммов ризобактерий, рекомбинантных по генам: *pssA*, *rosR* (гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов) и *rapA1* (ген, ответственный за агглютинацию бактерий).

Так впервые были получены данные о структуре биопленок, образуемыми дикими ризобияльными штаммами: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702; и рекомбинантными штаммами ризобий: *R. leguminosarum*

Pvu5 rapA1, *R. leguminosarum* VSy12 *rapA1*, *R. leguminosarum* THy2 *rapA1*, *R. leguminosarum* TPr4 *rapA1*, *R. galegae* 0702 *rapA1*; *R. leguminosarum* Pvu5 *pssA*, *R. leguminosarum* VSy12 *pssA*, *R. leguminosarum* THy2 *pssA*, *R. leguminosarum* TPr4 *pssA*, *R. galegae* 0702 *pssA*; *R. leguminosarum* Pvu5 *rosR*, *R. leguminosarum* VSy12 *rosR*, *R. leguminosarum* THy2 *rosR*, *R. leguminosarum* TPr4 *rosR*, *R. galegae* 0702 *rosR*. И построены наглядные графики кривой роста и размножения клеток, исследуемых ризобийных штаммов.

Проведенное исследование позволило оценить биопленки, образованных исследуемыми ризобийными штаммами дикого типа и ризобиями с измененной экспрессией генов, так было обнаружено, что рекомбинантные штаммы ризобий формируют более сложные архитектурные структуры биопленок по сравнению с дикими штаммами, а высокие показатели числа живых клеток от времени не всегда коррелируют со способностью штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

Все исследуемые нами штаммы ризосферных бактерий обладают полезным ростостимулирующим эффектом, и могут быть рекомендованы как биопрепараты, так как способность этих штаммов образовывать биопленки в ризосфере повышает их конкурентоспособность в естественных условиях. А тот факт, что при формировании этими штаммами биопленок происходит рост сопротивляемости растений к биотическим и абиотическим негативным факторам, имеет большое практическое значение в сельском хозяйстве.

Используемый в работе подход раскрывает сущность процесса образования бактериями биопленок, и может быть рекомендован в качестве основной методики при изучении патогенов человека и животных, образующих биопленки. Так, например, зная время, за которое штаммы образуют биопленку, можно препятствовать данному процессу, прерывая его на стадии деления единичных планктонных клеток. Это существенно облегчит борьбу с патогенными микроорганизмами, исключит возможность образования штаммами устойчивых к антибиотикам биопленок.

Таким образом, проведенное исследование раскрывает сущность механизмов образования биопленки исследуемых ризобияльных штаммов дикого типа и рекомбинантных по генам *pssA*, *rosR* и *rapA1*.

ВЫВОДЫ

1. Проведено детальное микроскопическое исследование структур биопленок, образуемых ризобияльными штаммами дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702. Подтверждено, что исследованные штаммы ризобий способны к формированию биопленок.

2. Проведено детальное микроскопическое исследование структур биопленок, образуемых исследуемыми штаммами ризобий с измененной экспрессией по генам *rapA1*, *pssA* и *rosR*. Показано, что все они образуют биопленки на стерильных инертных поверхностях, в том числе и на полистироле. Обнаружено, что рекомбинантные штаммы ризобий по сравнению с дикими штаммами формируют более сложные архитектурные структуры биопленок.

3. Построены наглядные графики кривой роста и размножения клеток, исследуемых ризобияльных штаммов дикого типа и рекомбинантных по генам *rapA1*, *pssA*, *rosR*. Исходя из чего, было выявлено, что высокие показатели числа живых клеток от времени далеко не всегда указывают на способность штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки РАН: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011.
2. Бехало, В.А. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток, входящих в состав «медицинских биопленок» / В.А. Бехало, В.М. Бондаренко, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Микробиология. - 2010. - № 4. - С. 97-107.
3. Бондаренко, В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации / В.М. Бондаренко // М.: Изд-во «Триада». - 2011. – С. 88.
4. Буланцев, А.Л. Новые представления об экологии бактериальных популяций с коммуникативной системой сигнализации / А.Л. Буланцев, В.В. Елизаров // Проблемы особо опасных инфекций. - № 91. – 2006. - С. 11–12.
5. Бухарин, О.В. Ассоциативный симбиоз / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.В. Немцева, С.В. Черкасов // Екатеринбург: УрО РАН. - 2007. - С. 264.
6. Воробьева А.А. Клинические, анатомические, бактериологические и генетические особенности хронического бактериального и полипозного этмоидита: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.01.03 / Воробьева Анастасия Алексеевна. - Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова - ГБОУ ВПО. - Москва, 2014. - 155 с.
7. Габидова, А.Э. Основные начала возникновения резистентности в биосфере / А.Э. Габидова, В.А. Галынкин // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – № 3-1. – С. 92-102.

8. Гинцбург, А.Л. “Quorum sensing” или социальное поведение бактерий / А.Л. Гинцбург, Т.С. Ильина, Ю.М. Романова // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. - 2003. - № 5. - С. 86–93.
9. Глушанова, Н.А. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // Медицина в Кузбассе. – 2015. - № 2. - С. 30 – 35.
10. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. - 2010; - Т.2. - № 3. – С. 4—15.
11. Добровольская, Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв / Т. Г. Добровольская // М.: Наука. - 2002. – С. 282.
12. Завалин, А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А.А. Завалин. – М.: Изд-во ВНИИА. - 2005. – С. 302.
13. Звягинцев, Д.Н. Растения как центры формирования бактериальных сообществ / Д.Н. Звягинцев, Т.Г. Добровольская, Л.В. Лысак // Журн. общей биологии. – 1993. – Т. 54. – С. 183–199.
14. Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. - 2004. - Т. 40. - С. 1445- 1456.
15. Кравченко, Л.В. Выделение и фенотипическая характеристика ростостимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования грибов / Л.В. Кравченко, Н.М. Макарова, Т.С. Азарова // Микробиология. - 2002; - Т. 71. - № 4. - С. 521–525.
16. Кулишов, С.А. Микробные биопленки как объект изучения в научно-исследовательской работе учащихся / С.А. Кулишов, И.Н. Лыков // Молодой ученый. - 2016. - №4. - С. 240-245.
17. Лавина, А.М. Получение рекомбинантных по генам pssA и rosR ризобактериальных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP / А.М.

Лавина, Л.Р. Хакимова, Р.Т. Матниязов, З.Р. Вершинина, Ал.Х. Баймиев // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2017. - № 9 (209). - С. 76-81. - ISSN 1814-6457.

18. Марданова, А.М. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования: учебно-методическое пособие /А.М. Марданова, Д.А. Кабанов, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова // Казань: Центр печати «Линк». - 2016. – С. 48.

19. Николаев, Ю.А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. - 2007. - Т. 76. - № 2. - С. 149-163.

20. Окулич, В.К. Роль микробных биопленок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе / В.К. Окулич, Ф.В. Плотников, А.А. Кабанова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2012. — №4. — С.70—82.

21. Окулич, В.К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников // Витебск: ВГМУ. - 2017. – С. 300.

22. Петрухина М. И. Эпидемиологическое значение бактериальных пленок (обзор) / М.И. Петрухина, Г.В. Ющенко, Н.Г. Политова // Медиаль. - 2015. - №3 (17). - С. 9-17.

23. Плюта, В.М. Особенности образования биопленок и Quorum Sensing регуляция при действии антибактериальных агентов: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: специальности 03.01.06 Биотехнология, 03.02.03 Микробиология / Плюта Владимир Александрович. - Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, г. Москва, 2014. – 152 с.

24. Романова, Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. - N 3. - С.99-109.

25. Симонова, И.Р. Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок / И.Р. Симонова, С.Н. Головин, Л.М. Веркина, Е.А. Березняк, С.В. Титова // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. - 2017. - №1. - С. 75-81.
26. Смирнова, Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова [и др.] // Микробиология. – 2010. - Т. 79. - № 4. - С. 435–446.
27. Спайнк, Г. Rhizobiaceae: молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Г. Спайнк, А. Кондороши, П. Хукас. // Пер. с англ. – СПб.: Бионт. - 2002. – С. 567.
28. Стрелкова, Е.А. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды / Е.А. Стрелкова, Н.В. Позднякова, М.В. Журина, В.К. Плакунов, С.С. Беляев // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – №2. – С. 131-138.
29. Тец, В. В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии / В.В Тец, Г.В. Тец // Пульмонология и аллергология. - 2013. - № 4. - С. 60-64.
30. Хадри, А.Е. Разнообразие процессов образования корневых клубеньков и их инфицирование ризобиями / А.Е. Хадри, Г. Спайк, Т. Бисселинг, Н. Бревин // Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайка, А. Кондороши, П. Хукаса; Рус. Перевод под ред. А.И. Тихоновича. – СПб. - 2002. – С. 373-386.
31. Хакимова, Л.Р. Бактериальный адгезин RapA1 Rhizobium leguminosarum как инструмент в биоинженерии микробно-растительных симбиозов: диссертация кандидата Биологических наук: 03.02.03 / Хакимова Лилия Ралисовна. - ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, 2017. - 143 с.
32. Харсеева, Г.Г. Биопленки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса / Г.Г. Харсеева, Я.Н.

Фролова, А.Ю. Миронов // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. – № 4. – С. 346-354.

33. Хмель, И.А. Биопленки бактерий и связанные с ними трудности медицинской практики // ИМГ РАН. - 2014.

34. Хренов, П.А. Обзор методов борьбы с микробными биопленками при воспалительных заболеваниях / П.А. Хренов, Т.В. Честнова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. - 2013. - №1. – С. 2-13.

35. Хренов, П.А. Эффект диметилсульфоксида в отношении биоплёнкообразования штаммами *Staphylococcus aureus* / П.А. Хренов, Т.В. Честнова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2014. - № 5-1. - С. 140–141.

36. Цавкелова, Е.А. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей / Е.А. Цавкелова, Т.А. Чердынцев, А.И. Нетрусов // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – № 1. – С. 55-62.

37. Цавкелова, Е.А. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов / Е.А. Цавкелова, С.Ю. Климова, Т.А. Чердынцев, А.И. Нетрусов // Прикл.биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – № 3. – С. 261-268.

38. Цыганова, А.В. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями / А.В. Цыганова, В.Е. Цыганов // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. – №. 2. – С. 211-222.

39. Чернявский, В.Н. Бактериальные биопленки и инфекции (лекция) / В.Н. Чернявский // Annals of Mechnikov Institute. – 2013. - № 1.

40. Юркевич, Д.И. Медузомицет (чайный гриб): научная история, состав, физиология и метаболизм / Д.И. Юркевич, В.П. Кутушенко // Биофизика. - 2002. - Т. 47. - С. 1116-1129.

41. Allan, V.J.M. Effect of nutrient limitation and phosphate activity of *Citrobacter* sp. / V.J.M. Allan, M.F. Callow, L.E. Macaskie, M. Paterson-Beedle // *Microbiology*. - 2002. - V. 148. - P. 277–288.
42. Ausmees, N.A. Unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin RapA belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* / N. Ausmees, K. Jacobsson, M. Lindberg // *Microbiology*. – 2001. – V. 147. – P. 549-559.
43. Bais, H.B. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production / H.B. Bais, R. Fall, J.M. Vivanco // *Plant Physiol.* - 2004. - V. 134. - P. 307–319.
44. Bianciotto, V. Muroid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots / V. Bianciotto, S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante, S. Perotto // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2001. – V. 14. - P. 255–260.
45. Blango, M.G. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics / M.G. Blango, M.A. Mulvey // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. - V. 54. - №5. - P. 855–1863.
46. Bogino, P.C. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations / P.C. Bogino, M.M. Oliva, F.G. Sorroche, W. Giordano // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V.14. – P. 15838-15859.
47. Branda, S.S. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis* / S.S. Branda, J.E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick, R. Kolter // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2001. - V. 98. - P. 11621–11626.
48. Branda, S.S. Biofilms: the matrix revisited / S.S. Branda, A. Vik, L. Friedman, R. Kolter // *Trends in Microbiol.* - 2005. - V. 13. - № 1. - P. 21–25.
49. Carpentier, B. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry / B. Carpentier, O. Cerf // *J. Appl. Bacteriol.* - 1993. - V. 75. - № 6. - P. 499– 511.

50. Costerton, J. Biofilms, the customized microniche / J.W. Costerton, Z.L. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber, G. James // J. Bacteriol. - 1994. - V. 1176. - P. 2137–2142.
51. Costerton, J.W. Bacterial bio film: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // Science. - 1999. - V. 284. - P. 318–322.
52. Davies, D.G. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm / D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, E.P. Greenberg // Science. - 1998. - V. 280. - P. 295–298.
53. Dazzo, F.B. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosist / F.B. Dazzo, G.L. Truchet, J.E. Sherwood, E.M. Hrabak, M. Abe, S.H. Pankratz // Applied and environmental microbiology. - 1984. - V. 48. - № 6. - P. 1140-1150.
54. De Beer, D. Microbial Biofilms / D. De Beer, P. Stoodley // New York: Springer-Verlag. - 2004.
55. Downie, J.A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots / J.A. Downie // FEMS microbiology reviews. – 2010. – T. 34. – № 2. – C. 150-170.
56. Ellermeier, C.D. Three-Protein Signaling Pathway Governing Immunity to a Bacterial Cannibalism Toxin / C.D. Ellermeier, E.C. Hobbs, J.E. Gonzalez-Pastor, R.A. Losick // Cell. - 2006. – V. 124. - P. 549–559.
57. Flemming, H.C. Biofilms and environmental protection / H.C. Flemming // Wat. Sci. Tech. - 1993. - V. 27, - №7-8. - P. 1-10.
58. Flemming, H.C. The biofilm matrix / H.C. Flemming, J. Wingender // Nature Rev. Microbiol. – 2010. – V. 8. – P. 623-633.
59. Fujishige, N.A. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation / N.A. Fujishige N.N. Kapadia, P.L. De Hoff, A.M. Hirsch // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006. – V. 56. – № 2. – P. 195.

60. Gilbert, P. Biofilm susceptibility to antimicrobials / P. Gilbert, J. Das, I. Foley // *Adv. Dent. Res.* - 1997. - № 11. - P.160-167.
61. Gilbert, P. Common therapeutic approaches for the control of oral biofilms: microbiological safety and efficacy / P. Gilbert, A. McBain, P. Sreenivasan // *Clin Microbiol Infect.* – 2007. – Suppl. 4. – P. 17–24.
62. Harrison, J.J. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli* / J.J. Harrison, *et al.* // *Microbiology.* - 2005. - V. 151. - Pt. 10. - P. 3181.
63. Hobley, L. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes / L. Hobley, C. Harkins, C.E. MacPhee, N.R. Stanley-Wall // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2015. - V. 39. - P. 649-669.
64. Janczarek, M. Mutation in the pssB-pssA intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* affects the surface polysaccharides synthesis and nitrogen fixation ability / M. Janczarek, J. Krol, J. Kutkowska, A. Mazur, J. Wielbo, W. Borucki, J. Kopcinska, B. Lotocka, T. Urbanik-Sypniewska, A. Skorupska // *Journal of plant physiology.* – 2001. – T. 158. – № 12. – P. 1565-1574.
65. Kang, S.H. Cloning, sequencing and characterization of a novel gen, *phoI*, from soil bacterium *Enterobacter* sp.4 / S.H. Kang, K.K. Cho, J.D. Bok *et al.* // *Curr. Microbiol.* – 2006. – V. 52. – № 4. – P. 243-248.
66. Kao, C.V. Utilization of the metano-cyano complex tetracyanonickelate by *Azotobacter vinelandii* / C.V Kao, S.H. Li, Y.L. Chen, S.S. Chen // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2005. – V. 41. – № 2. – P. 216-220
67. Karatan, E. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms / E. Karatan, P. Watnick // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2009. – Vol. 73. - №2. – P.310–347.
68. Karsten, U. Die Mikrobenmatte – das kleinste Ökosystem der Welt / U. Karsten, M. Kühl // *Biologie Unserer Zeit.* - 1996. - V. 26. - P. 16–26.

69. Keren, I. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* / I. Keren, D. Shah, A. Spoering, N. Kaldalu, K. Lewis // *J. Bacteriol.* - 2004. - V. 186. № 24. - P. 8172.
70. Klausen, M. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / M. Klausen, A. Aaes-Jorgensen, S. Molin, T. Tolker-Nielsen // *Mol. Microbiol.* - 2003. - V. 50. - P. 61–68.
71. Kolenbrander, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems / P.E. Kolenbrander // *Annu. Rev. Microbiol.* - 2000. - V. 54. - P. 413–437.
72. Kolenbrander, P.E. Communication among oral bacteria / P.E. Kolenbrander, R.N. Andersen, D.S. Blehert, P.G. Egland, J.S. Foster, R.J. Palmer // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2002. - V. 66. - P. 486–505.
73. Kroes, I. Bacterial diversity within the human subgingival crevice / I. Kroes, P.W. Lepp, D.A. Relman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1999. - V. 96. - P. 14547–14552.
74. Lebeaux, D. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections / D. Lebeaux, L. Chauhan, O. Rendueles, C. Beloin // *Pathogens.* - 2013. - V. 2. - P. 288- 256.
75. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease / K. Lewis // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2007. - V. 5. - № 1. - P. 48-56.
76. MacLeod, F.A. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor / F.A. MacLeod, S.R. Guiot, J.W. Costerton // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1990. - V. 56. - P. 1598–1607.
77. Mansfield, J. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology / J. Mansfield, S. Genin, S. Magori, V.,Citovsky, M. Sriariyanum, P. Ronald, M. Dow, V. Verdier, S.V. Beer, M.A. Machado et al. // *Mol. Plant Pathol.* – 2012. – V. 13. – P. 614-629.

78. Markova, Yu.A. Mechanisms of bacterial polyhostality / Yu.A. Markova, A.S. Romanenko, T.N. Shafikova // *Jornal of Stress Physiology and Biochemistry. Rev.* – 2007. – V. 3. – № 2. – P. 18.
79. Matthyse, A.G. The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens* / A.G. Matthyse, M. Marry, L. Krall et. al. // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* - 2005. – V. 18. - № 9. - P. 1002–1010.
80. Mayser, P. The yeast spectrum of the «tea fungus Kombucha» / P. Mayser, S. Fromme, C. Leitzmann, K. Grunder // *Mycoses.* - 1995. - V. 38. - P. 289–295.
81. McDougald, D. Signal-mediated cross-talk regulates stress adaptation in *Vibrio* species / D. McDougald, S. Srinivasan, S.A. Rice, S. Kjelleberg // *Microbiology.* – 2003. – Vol. 149. - № 7. – P.1923–1933.
82. Michiels, K. W. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots / K.W. Michiels, C.L. Cross, J. Vanderleyden // *Journal of General Microbiology.* - 1991. – V. 137. - P. 2241-2246.
83. Miller, M.B. Quorum sensing in bacteria / M.B. Miller, B.L. Bassler // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2001. – 55. – P. 165–199.
84. Mohamed, J. A. Biofilm formation by enterococci / J. A. Mohamed, D. B. Huang//*J. of Med. Microb.* – 2006. - № 56. - P. 1581–1588.
85. Mohamed, J.A. Biofilm formation by enterococci / J.A. Mohamed, D.B. Huang // *J. of Med. Microb.* – 2007. – №56. – P.1581–1588.
86. Mongiardini, E.J. The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation / E.J. Mongiardini, N. Ausmees, J. Perez-Gimenez // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2008. – V. 65. – P. 279-288.
87. Mongiardini, E.J. Overproduction of the rhizobial adhesin RapA1 increases competitiveness for nodulation / E.J. Mongiardini, J. Perez-gimenez, M.J. Althabegoiti, J. Covelli, J. I. Quelas, S. L. Lopez-garcia, A. Lodeiro // *Soil Biology and Biochemistry.* – 2009. – V.41. – P. 2017-2020.

88. Moons, P. Bacterial interactions in biofilms / P. Moons, [et. al.] // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2009. – Vol. 35, №3. – P. 157–168.
89. Morikawa, M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species / M. Morikawa // *J. Biosci. Bioengin.* - 2006. - V. 101. - P. 1–8.
90. Nadeem, S.M. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments / S.M. Nadeem, M. Ahmad, Z.A. Zahir, A. Javaid, M. Ashraf // *Biotechnol. Adv.* – 2014. – V. 32. – P. 429-448.
91. Okabe, S. Sulfate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions / S. Okabe, T.P. Ito, H. Satoh // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2003. - V. 63. - P. 322–334.
92. Pace, J.L. Biofilms, infection and antimicrobial therapy / J.L. Pace, et. al. // Boca Raton: Taylor and Francis Group. - 2006. – P. 495.
93. Patti, J.M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues / J.M. Patti [et al.] // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1994. – V. 48. – P. 585–617.
94. Pliego, C. Plant Growth-Promoting Bacteria: Fundamentals and Exploitation / C. Pliego, F. Kamilova, B. Lugtenberg // *Bacteria in Agrobiolology: Crop Ecosystems*. Ed. by: Maheshwari D. K. P. – 2011. – P. 295-343.
95. Ramey, B.E. Biofilm formation in plant–microbe associations / B.E. Ramey, M. Koutsoudis, S.B. von Bodman, C. Fuqua // *Curr Opin Microbiol.* – 2004. - V. 7. – P. 602–609.
96. Rice, S.A. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues / S.A. Rice, K.S. Koh, S.Y. Queck, M. Labbate, K.W. Lam, S. Kjelleberg // *J. Bacteriol.* - 2005. - V. 187. - P. 3477– 3485.

97. Rickard, A.H. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms / A.H. Rickard, P. Gilbert, N.J. High, P.E. Kolenbrander, P.S. Handley // Trends Microbiol. - 2003. - V. 11. - P. 94–100.
98. Rinaudi, L.V. An integrated view of biofilm formation in rhizobia / L.V. Rinaudi, W. Giordano // FEMS microbiology letters. – 2010. – T. 304. – №. 1. – C. 1-11.
99. Rudrappa, T. Causes and consequences of plant-associated biofilms / T. Rudrappa, M.L. Biedrzycki, H.P. Bais // FEMS Microbiol. Ecol. – 2008. – V. 64. – P. 153-166.
100. Russo, D.M. Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum* / D.M. Russo, A. Williams, A. Edwards, D.M. Posadas, C. Finnie, M. Dankert, J.A. Downie, A. Zorreguieta // J. Bacteriol. – 2006. – V. 188. - P. 4474–4486.
101. Simmons, W.L. A stochastic mechanism for biofilm formation by *Mycoplasma pulmonis* / W.L. Simmons [et al.] // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. - N 3. – P. 1905–1913.
102. Smit, G. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca²⁺ -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips / G. Smit, J.W. Kijne, B. J. Lugtenberg // J Bacteriol. – 1987. – V. 169. – P. 4294-4301.
103. Smit, G. Role of Ca²⁺ in the activity of rhicadhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, which mediates the first step in attachment of Rhizobiaceae cells to plant-root hair tips / G. Smit, D.M.J. Tubbing, J.W. Kijne, B.J.J. Lugtenberg // Arch Microbiol. – 1991. – V. 155. – P. 278-283.
104. 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.-P. 2897-2903.
105. Sponza, D.T. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under

steady-state conditions / D.T. Sponza // *Enzyme Microb. Technol.* - 2003. - V.32. - № 3. - P. 375-385.

106. Stanley, N.R. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation / N.R. Stanley, B.A. Lazazzera // *Mol. Microbiol.* - 2004. - V. 52. - P. 917–924.

107. Stoodley, P. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure / P. Stoodley, I. Dodds, J.D. Boyle, H.M. Lappin-Scott // *J. Appl. Microbiol.* - 1999. - V. 85. - P. 19–28.

108. Sutherland, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework / I.W. Sutherland // *Microbiology.* – 2001. – Vol. 147. – P. 3–9.

109. Tetz, V.V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies / V.V. Tetz // *Med Microbiol. Lett.* – 1996. - V. 5. – P. 426-436.

110. Wagner, M. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants / M. Wagner, A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, H. Daims // *Antonie van Leeuwenhoek.* - 2002. - V. 81. - P. 665–680.

111. Ward, D.M. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities / D.M. Ward, M.J. Ferris, S.C. Nold, M.M. Bateson // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 1998. - V. 62. - № 4. - P. 1353–1370.

112. Whitehead, N.A. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria / N.A. Whitehead, A.M.L. Barnard, H. Slater, N.J.L. Simpson, G.P.C. Salmond // *FEMS Microbiology Reviews.* – 2001. – Vol. 25. – P. 365–404.

113. Williams, P. Quorum sensing, communication and crosskingdom signalling in the bacterial world / P. Williams // *Microbiology.* – 2007. – № 153. – P. 3923–3938.

114. Williams, A. Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection / A. Williams, A. Wilkinson, M. Krehenbrink, D. Russo, A. Zorreguieta, J.A. Downie // *J. Bacteriol.* – 2008. – V. 190. – № 13. – P. 4706.

115. Xavier, J.B. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study / J.B. Xavier, [et. al.] // Microbiology. – 2005. – №151. – P. 3817–3832.
116. Zapata, M. The inhibitory effect of biofilm produced by wild bacterial iso lates to the larval settlement of the fouling ascidia *Ciona intestinalis* and *Pyura praeputalis* / M. Zapata, F. Silva, F. Luza, M. Wilkens, C. Riquelme // Biofilms. - 2007. - V. 10. - № 1. - P. 1–4.
117. Zhurina, M.V. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms / M.V. Zhurina, A.V. Gannesen, E.L. Zdrovenko, V.K. Plakunov // Microbiology. – 2014. – V. 83. – № 6. – P. 713-722.

ПРИЛОЖЕНИЕ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

С. Э. Аксенова, Т. С. Издерганова, А. М. Славина

В НОМИНАЦИИ

Микробиология растений

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ *А. К. Баймиев*

83-й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ

МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

СЕРТИФИКАТ

УЧАСТНИКА (ЦЫ) Аксенова С.А., Аздерканов С.С., Малинов А.М.
 НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ д.б.н., профессор А.К. Байшев

83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых
 с международным участием

«Вопросы теоретической и практической медицины»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов



АКСЮКОВА ЕКАТЕРИНА ЭДУАРДОВНА

принял(а) участие в работе школы-семинара

HTSDD-2018

High throughput screening in drug discovery

состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич





Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №3, 2018

vestnikbgmu.ru

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ К ИНСУЛИНУ ПРИ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ	1164
У.И. Субхангулов, Т.И. Мальцева	
ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ	1169
Н.О. Камалетдинова	
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ	1173
Р.К. Динова, А.В. Цветкова, К.В. Хлопова, О.В. Буйлова	
ВЫДЕЛЕНИЕ АУТОШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ	1178
А. Р. Аюпова	
ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АССОЦИИ I/D ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА АНГИОТЕНЗИН ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФИЗИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ И ТОЛЕРАНТНОСТИ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ У СТУДЕНТОВ.....	1183
Г.С. Аздерханова, Е.Э. Аксюкова, А.М. Лавина	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА <i>RHIZOBIUM</i>	1188
Э.М. Муратов, Ю.Л. Баймурзина	
АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПРОДУКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ	1193
Э. И. МУХАМЕТЗЯНОВА, Е. Р. ЯКУПОВА	
ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	1197
Е. Э. Аксюкова, Г. С. Аздерханова, А. М. Лавина	
МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА <i>RHIZOBIUM</i>	1201
Э. Р. Ганиева, А.А. Измайлова	
БИОИНДИКАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА СЕЛА АСКИНО ПО СОСТОЯНИЮ <i>PINUS SYLVESTRIS</i> L.....	1206
Общественное здоровье и здравоохранение, история медицины	
Р. Р. Даутов	
МЕДИКО – СОЦИАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ТРАВМАМИ.....	1213
А. С. Абдуллина, Г. И. Гарифуллина, Р. К. Фазлинуров, Н. Ф. Тимерханова	
АНАЛИЗ ИНФОРМИРОВАННОСТИ НАСЕЛЕНИЯ О ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА, УРОВНЯ ОБРАЗОВАНИЯ И МЕСТА ПРОЖИВАНИЯ	1218

УДК 579.262:579.6

Е. Э. Аксюкова, Г. С. Аздерханова, А. М. Лавина

**МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОПЛЕНОК,
ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *RHIZOBIUM***

Научный руководитель – д.б.н., профессор Ал. Х. Баймиев

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, Башкирский государственный
медицинский университет, г. Уфа

Институт биохимии и генетики, УФИЦ РАН, г. Уфа

Резюме. В результате проведенного детального микроскопического исследования структур, образованных ризобияльными штаммами дикого типа и ризобиями с измененной экспрессией генов: *pssA* и *rosR* (гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов), а также с геном *rapA1* (ответственным за агглютинацию бактерий), нами было показано, что полученные рекомбинантные штаммы ризобий формируют более сложные архитектурные структуры биопленок по сравнению с дикими штаммами, а высокие показатели числа живых клеток от времени не всегда коррелируют со способностью штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

Ключевые слова: биопленки, *Rhizobium*, *pssA*, *rosR*, *rapA1*.

Е. Е. Aksyukova, G. S. Azderhanova, A. M. Lavina

**MICROSCOPIC STUDY OF THE STRUCTURE OF BIOFILMS OBTAINED BY BACTERIA OF
THE GENUS *RHIZOBIUM***

Scientific Advisor – Ph. D. in Biological, Full professor Al. H. Baimiev

Department of Fundamental and Applied Microbiology, Bashkir State Medical University, Ufa

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa

Abstract. The detailed microscopic investigations of the structures formed by wild-type strains and altered gene expression of nodule bacteria that are *pssA* and *rosR* (such type of genes involved in exopolysaccharide biosynthesis) as well as *rapA1* gene (it is involved in bacteria agglutination) were conducted. Consequently, the investigated recombinant strains of nodule bacteria form more complex biofilms structures in comparison with wild strains; moreover high rate numbers of living cells are not always indicatives of strain ability to fast form of mature biofilms.

Keywords: biofilm, *Rhizobium*, *pssA*, *rosR*, *rapA1*.

Введение. В настоящее время общепризнано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде биопленок. Биопленки - это бактериальные сообщества, состоящие из клеток, которые прикреплены к поверхности или друг к

другу, и заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, демонстрирующие изменение фенотипа, выраженного изменением параметров роста и экспрессии специфичных генов [1].

Микроорганизмы рода *Rhizobium* формируют биопленки на поверхности корней бобовых растений. Это сложный и строго регулируемый процесс, состоящий из нескольких стадий развития. На первом этапе происходит первичное прикрепление бактерий к поверхности корней бобовых, в котором участвуют как растительные лектины, так и бактериальные адгезины, необходимые для агрегации и стабилизации биопленки [7]. Следующий этап прикрепления требует синтеза бактериальных целлюлозных фибрилл, обеспечивающих необратимое связывание бактерий на корнях [4]. С последующим ростом и увеличением числа ризобий, активную роль в формировании биопленок играют экзо- и липополисахариды, а также Nod-факторы [3], обеспечивающие прочную адгезию. На этой стадии клетки активно делятся, а выделяемый матрикс удерживает вместе всю колонию.

Физиологическое значение образования биопленок ризобактериями состоит в создании и поддержании благоприятных условий для их существования. Исследования доказывают, что биопленки являются наиболее распространенной и выгодной стратегией жизни для бактерий в естественных средах [6], как структуры устойчивые к факторам стресса, таким как засуха, нехватка питательных веществ, УФ-излучение, хищничество и антибиоз [2,5].

В настоящее время многие механизмы формирования биопленок изучены, но тем не менее, до сих пор не представлено комплексного взгляда на образование биопленок, связанного с определением экспрессии генов, ответственных за различные стадии развития биопленок и их регуляцию. В виду этого цель данного исследования - изучение структуры биопленок, образуемых дикими и рекомбинантными по генам регуляции синтеза экзополисахаридов *pssA*, *rosR* и адгезина *rapA1*, штаммами бактерий рода *Rhizobium*.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали штаммы бактерий из рабочей коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: *R.leguminosarum* PVu5, *R.leguminosarum* THy2, *R.leguminosarum* TPr4, *R.leguminosarum* VSy12, *R.galegae* 0702 дикого типа и рекомбинантные по генам: *pssA*, *rosR* (гены, участвующие в биосинтезе экзополисахаридов) и *rapA1* (ген, ответственный за агглютинацию бактерий). Нами были проведены детальные микроскопические исследования структур биопленок, окрашенных по методу Грама. Также оценили зависимость числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде, в течение 1, 4, 16, 24 и 48 часов, с построением кривой роста и размножения, представленной в виде логарифма.

Результаты и обсуждения. В случае разновидностей штамма *R.leguminosarum* PVu5 мы выяснили, что рост клеток рекомбинантных штаммов происходит интенсивнее по сравнению с диким штаммом, так как наибольшее количество клеток наблюдалось у штаммов *R.leguminosarum* PVu5 *rapA1* и

R.leguminosarum PVu5 *rosR*. Примечательным оказался тот факт, что эти же штаммы образовывали более сложные структуры биопленок (имелось большее количество выстроенных тяжей).

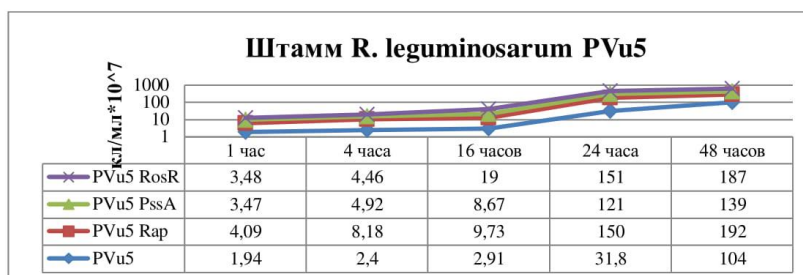


Рис. 1. Кривая роста и размножения штаммов *R.leguminosarum* PVu5 (дикий тип), *R.leguminosarum* PVu5 *rapA1*, *R.leguminosarum* PVu5 *pssA*, *R.leguminosarum* PVu5 *rosR*, представленная в виде логарифма.

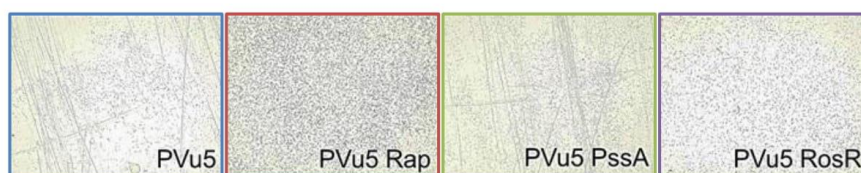


Рис. 2. Биопленка, образованная штаммом *R.leguminosarum* PVu5 за 7 суток.

При микроскопировании разновидностей штамма *R. leguminosarum* THy2 биопленки наблюдались во всех случаях. Наибольшего развития достигла биопленка, образуемая штаммом *R.leguminosarum* THy2 *rapA1*, несмотря на то, что после 2-х суточных измерений показатель количества клеток данной культуры был незначительно ниже штамма дикого типа и сильно отставал от показателей штаммов *R.leguminosarum* THy2 *pssA* и *rosR*. Эти штаммы показали схожие результаты прироста клеток и степени образования биопленок.



Рис. 3. Биопленка, образованная штаммом *R.leguminosarum* THy2 за 7 суток.

Значения измерений количества клеток рекомбинантных разновидностей штамма *R.leguminosarum* TPr4 было примерно одинаковым и оказалось значительно выше штамма дикого типа. Несмотря на это биопленка, формируемая штаммом *R.leguminosarum* TPr4 дикого типа, находилась на более старшей стадии развития по отношению к биопленкам штаммом *R.leguminosarum* TPr4 *pssA* и *R.leguminosarum* TPr4 *rosR*. Наиболее быстрый рост клеток показал штамм *R.leguminosarum* TPr4 *rapA1*, в отношении которого мы наблюдали самую зрелую биопленку из всех изученных.

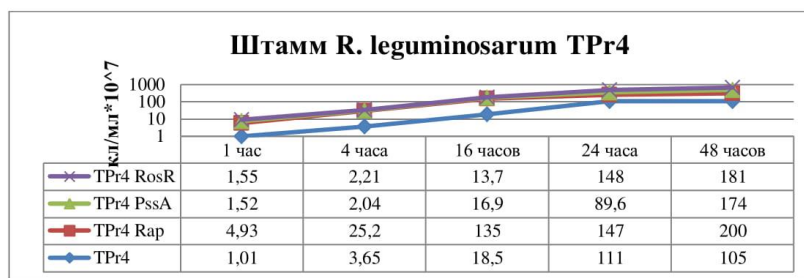


Рис. 4. Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* TPr4 (дикий тип), *R. leguminosarum* TPr4 *rapA1*, *R. leguminosarum* TPr4 *pssA*, *R. leguminosarum* TPr4 *rosR*, представленная в виде логарифма.

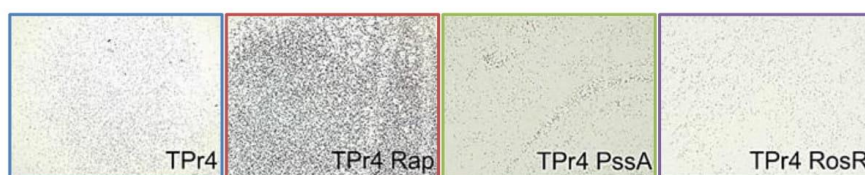


Рис. 5. Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* TPr4 за 7 суток.

Далее были проанализированы значения разновидностей штамма *R. leguminosarum* VSy12. Показатели штамма дикого типа в лаг-фазе, экспоненциальной фазе и фазе стационарного роста оказались выше некоторых показателей рекомбинантных штаммов. Однако при микроскопировании, именно в отношении данного штамма, встречалось самое большое количество единичных клеток, возможно это связано с тем, что для образования зрелой биопленки штамму *R. leguminosarum* VSy12 необходимо больше времени. В стационарной фазе наименьшее количество клеток показал штамм *R. leguminosarum* VSy12 *rapA1*, однако в его случае мы наблюдали образованную биопленку. Самая зрелая биопленка была у штамма *R. leguminosarum* VSy12 *pssA*.



Рис. 6. Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* VSy12 за 7 суток.

Наивысшие средние показатели числа живых клеток от времени мы отметили у разновидностей штамма *R. galegae* 0702, причем как у штамма дикого типа, так и у рекомбинантных штаммов. Такой быстрый рост клеток сказался и на образовании биопленок, так как наиболее зрелые биопленки мы также отметили в этом случае. Несмотря на то, что гены *pssA* и *rosR* участвуют в биосинтезе экзополисахаридов у штаммов вида *R. leguminosarum*, при микроскопировании биопленок штаммов *R. galegae* 0702 с геном *pssA* или *rosR*, мы наблюдали зрелую биопленку, более сложной архитектуры по сравнению с биопленкой штамма дикого типа.



Рис. 7. Биопленка, образованная штаммом *R. galegae* 0702 за 7 суток.

Вывод. Проведенное детальное микроскопическое исследование структур, показало, что рекомбинантные штаммы ризобий по сравнению с дикими штаммами формируют более сложные архитектурные структуры биопленок, а высокие показатели числа живых клеток от времени далеко не всегда указывают на способность штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-00902А; №16-34-01076 мол_а; №17-44-020201р_а; РФФИ № 18-34-00033 мол_а.

Список литературы:

1. Окулич В.К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с. : ил.
2. Стрелкова Е.А. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды / Е.А. Стрелкова, Н.В. Позднякова, М.В. Журина, В.К. Плакунов, С.С. Беляев // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – №2. – С. 131-138.
3. Цыганова А. В., Цыганов В. Е. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. – №. 2. – С. 211-222.
4. Dazzo F.B., Truchet G.L., Sherwood J.E., Hrabak E.M., Abe M., Pankratz S.H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosist // Applied and environmental microbiology. 1984. - V. 48, № 6. - P. 1140-1150.
5. Flemming H.C. Biofilms and environmental protection // Wat. Sci. Tech.1993. Vol. 27, №7-8. P. 1-10.
6. Fujishige N.A. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation / N.A. Fujishige N.N. Kapadia, P.L. De Hoff, A.M. Hirsch // FEMS Microbiol. Ecol. – 2006. – V. 56. – № 2. – P. 195.



Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №3, 2018

vestnikbgmu.ru

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ К ИНСУЛИНУ ПРИ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ	1164
У.И. Субхангулов, Т.И. Мальцева	
ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ	1169
Н.О. Камалетдинова	
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ	1173
Р.К. Динова, А.В. Цветкова, К.В. Хлопова, О.В. Буйлова	
ВЫДЕЛЕНИЕ АУТОШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ	1178
А. Р. Аюпова	
ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АССОЦИИ I/D ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА АНГИОТЕНЗИН ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФИЗИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ И ТОЛЕРАНТНОСТИ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ У СТУДЕНТОВ.....	1183
Г.С. Аздерханова, Е.Э. Аксюкова, А.М. Лавина	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА <i>RHIZOBIUM</i>	1188
Э.М. Муратов, Ю.Л. Баймурзина	
АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПРОДУКТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ	1193
Э. И. МУХАМЕТЗЯНОВА, Е. Р. ЯКУПОВА	
ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	1197
Е. Э. Аксюкова, Г. С. Аздерханова, А. М. Лавина	
МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА <i>RHIZOBIUM</i>	1201
Э. Р. Ганиева, А.А. Измайлова	
БИОИНДИКАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА СЕЛА АСКИНО ПО СОСТОЯНИЮ <i>PINUS SYLVESTRIS</i> L.....	1206
Общественное здоровье и здравоохранение, история медицины	
Р. Р. Даутов	
МЕДИКО – СОЦИАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ТРАВМАМИ.....	1213
А. С. Абдуллина, Г. И. Гарифуллина, Р. К. Фазлинуров, Н. Ф. Тимерханова	
АНАЛИЗ ИНФОРМИРОВАННОСТИ НАСЕЛЕНИЯ О ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА, УРОВНЯ ОБРАЗОВАНИЯ И МЕСТА ПРОЖИВАНИЯ	1218

УДК 579.262

Г.С. Аздерханова, Е.Э. Аксюкова, А.М. Лавина

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ
ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ У БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM***

Научный руководитель - д.б.н., профессор Баймиев Ал.Х.

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского

Государственного Медицинского Университета, г. Уфа

Институт биохимии и генетики, УФИЦ РАН, г. Уфа

Резюме. Для исследования было выбрано 5 генов, участвующих в биосинтезе ризобияльных экзополисахаридов (*pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*). Проведен скрининг 99 штаммов *Rhizobium leguminosarum* (изолированных из клубеньков 6 видов дикорастущих бобовых растений) из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН на предмет наличия у них генов, регулирующих биосинтез ЭПС. Показано, что из 99 исследуемых штаммов только 1 штамм имеет все исследуемые гены. Ген *pssA* был идентифицирован у 26, ген *pssB* - у 21, ген *rosR* - у 31, ген *prsD* - у 21 и ген *prsE* - у 20 ризобияльных штаммов.

Ключевые слова: экзополисахариды (ЭПС), *Rhizobium leguminosarum*, ризобии, биопленка.

G. S. Azderhanova, E. E. Aksyukova, A. M. Lavina

**IDENTIFICATION OF GENES REGULATING THE BIOSYNTHESIS OF
EXZOPOLYSACCHARIDES IN BACTERIA OF THE GENUS *RHIZOBIUM***

Scientific Advisor – Ph. D. in Biological, Full professor Al. H. Baimiev

Department of Fundamental and Applied Microbiology of the Bashkir State Medical
University, Ufa

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of the Russian Academy of
Sciences, Ufa

Summary. Five genes involved in the biosynthesis of rhizobial exopolysaccharides (*pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* and *rosR*) were chosen for the study. Screened 99 strains of *Rhizobium leguminosarum* (out of nodules of 6 species of wild leguminous plants) from the collection of microorganisms IBG UFIC RAS for the presence of their genes regulating the biosynthesis of EPS. It is shown that of the 99 strains studied, only one strain has all the investigated genes. *PssA* gene was identified in 26, *pssB* gene in 21, *rosR*-31 gene, *prsD* gene in 21 and *prsE* gene in 20 rhizobial strains.

Key words: exopolysaccharides (EPS), *Rhizobium leguminosarum*, rhizobia, biofilm.

Актуальность. В род *Rhizobium* объединены почвенные бактерии, вызывающие образование специальных структур (клубеньков) на корнях бобовых растений. Внутри этих

узелков, в условиях симбиоза ризобии способны фиксировать азот, путем восстановления атмосферного азота до аммиака ферментативным комплексом - нитрогеназой [1].

Первоначальным этапом в формировании симбиотических отношений является прикрепление ризобий к поверхности корней растения-хозяина, путем обратимого и неспецифического связывания. Такое прикрепление представляет собой начальный этап формирования ризобиями биопленок на корнях растений. Наиболее важная роль в данном процессе принадлежит кислым внеклеточным полисахаридам или экзополисахаридам (ЭПС), синтезируемые азотфиксирующими бактериями [2].

Ризобияльные ЭПС представляют собой видоспецифические гетерополисахаридные полимеры, состоящие из простых сахаров, которые декорированы неуглеводными заместителями [3]. Синтезируемые ризобактериями ЭПС играют решающую роль в симбиотических взаимодействиях клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. Также они необходимы для роста и развития инфекционных нитей, представляющие собой специфичные трубчатые структуры, через которые бактерии проникают в клетки корня растения-хозяина [4]. В клетках свободноживущих ризобий ЭПС выполняют ряд других функций, таких как сбор питательных веществ, защита от экологических нагрузок, прикрепление к абиотическим и биотическим поверхностям и формирование биопленок, обеспечивающих адаптацию этих бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды [1].

Синтез повторяющихся звеньев ЭПС, их модификация, полимеризация и экспорт на клеточную поверхность контролируется генами, названных *exo* / *exs*, *exr* или *pss*, которые локализованы на ризобияльных мегаплазидах или хромосоме. Функция этих генов была идентифицирована путем выделения и характеристики нескольких мутантов, которые были отключены при синтезе ЭПС [3]. В данном исследовании мы остановимся лишь на 5 генах, регулирующих биосинтез ЭПС (*pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*). Большинство *pss* – генов, участвующих в биосинтезе ЭПС у *R. leguminosarum* организованы в виде оперона. Исключение составляет ген *pssA*, который локализован на удаленном расстоянии от указанного кластера и представляет собой моноцистронный оперон [5].

Ген *pssA* кодирует интегральный белок внутренней мембраны UDP-глюкозу: полипренил-фосфатную глюкозофосфотрансферазу, которая участвует в первом этапе синтеза ЭПС. Ген *pssA* выполняет важную роль в биосинтезе ЭПС. Мутанты по гену *pssA* не способны продуцировать ЭПС и, как следствие, нарушают нормальное развитие азотфиксирующих клубеньков на корнях бобовых растений и образование биопленок как *in vitro*, так и на корневых волосках [5].

После гена *pssA* локализуется ген *pssB*, кодирующий инозитолмонофосфатазу. Катаболизм инозита важен для выживания и конкуренции ризобияльных штаммов, что имеет решающее значение для успешного вторжения в клетки корня растения-хозяина [7]. Мутанты по гену *pssB* синтезируют большое количество ЭПС и индуцируют клубеньки с бактериоидами, которые не фиксируют азот. Дополнительные копии *pssB* в штамме дикого типа снижают уровень производства ЭПС. Это указывает на то, что *pssB* может играть роль в отрицательной регуляции синтеза ЭПС в *R. leguminosarum* [3].

Следующим, из рассмотренных нами регуляторных генов является *rosR*, который кодирует транскрипционный регулятор, участвующий в биосинтезе ЭПС. Мутация в гене *rosR* в *R. leguminosarum* приводит к 3-кратному уменьшению синтеза ЭПС и образованию у клевера клубеньков, которые не способны фиксировать атмосферный азот, тогда как множественные копии этого гена вызывают 2-кратное увеличение синтеза этого полимера. Это говорит о том, что ген *rosR* является положительным регулятором процесса синтеза ЭПС. На экспрессию *rosR* влияют такие факторы окружающей среды, как источники углерода, фосфатов и флавоноиды [6].

Были также признаны несколько других генов, важных для синтеза ЭПС, но не обязательно непосредственно участвующих в этом процессе. Так, например, гены *prsD* и *prsE* кодируют два компонента системы секреции белка I типа, которые необходимы для секреции белка NodO и внеклеточных белков с активной деградацией полисахаридов у *R. leguminosarum*. NodO представляет собой Ca^{2+} -связывающий белок, который служит для образования каналов в растительной плазматической мембране и играет роль в передаче сигналов в процессе клубенькообразования. Мутация генов *prsD* и *prsE* приводит к ухудшению синтеза ЭПС [3].

Накопленные данные подтверждают важность генетического контроля синтеза экзополисахаридов и изучения их биологических функций в симбиотических взаимодействиях между ризобиями и растением-хозяином.

Цель. Идентификация генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий *Rhizobium leguminosarum*

Материалы и методы. Материалом для исследования генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR* послужили 99 штаммов *Rhizobium leguminosarum* из коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (штаммы были изолированы из клубеньков 6 видов дикорастущих бобовых растений, после чего их ДНК были выделены с использованием ионообменной смолы Chelex).

Амплификация исследуемых генов проводилась методом полимеразной цепной реакции в амплификаторе МС-2 «Терцик». В состав реакционной смеси для ПЦР входили:

выделенная ДНК, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза), буфер и пара подобранных специфических праймеров. Подбор праймеров производился на основе базы данных NCBI в GenBank. Выбор праймеров проводили с помощью программы Primer Select

После ПЦР-исследования для идентификации продуктов амплификации был проведен горизонтальный электрофорез в агарозном геле. Затем гель окрашивался бромистым этидием для последующей визуализации результатов в проходящем УФ-свете трансиллюминатора.

Результаты и обсуждения. Проведенный скрининг штаммов *R. leguminosarum* на предмет наличия у них генов *pssA*, *pssB*, *prsD*, *prsE* и *rosR*, регулирующих биосинтез экзополисахаридов показал, что из 99 исследуемых штаммов только 1 штамм имеет все исследуемые гены. Кроме этого, в ходе исследования было выяснено, что: ген *pssA* был идентифицирован у 26 ризобияльных штаммов, ген *pssB* был идентифицирован у 21 ризобияльного штамма, ген *rosR* был идентифицирован у 31 ризобияльного штамма, ген *prsD* был идентифицирован у 21 ризобияльного штамма и ген *prsE* был идентифицирован у 20 ризобияльных штаммов.

Растение-хозяин	Количество штаммов	<i>pssA</i>	<i>pssB</i>	<i>rosR</i>	<i>prsD</i>	<i>prsE</i>
горошек заборный 9	12	3	5	2	5	9
горошек лесной 7	11	6	3	3	2	0
чина лесная 1	12	0	6	3	0	0
чина лесная 2	12	1	3	8	0	1
чина лесная 3	10	2	1	3	6	0
чина лесная 4	10	1	3	6	4	0
чина гороховидная 4	12	7	0	2	0	10
чина луговая 5	10	3	0	2	2	0
чина Литвинова 3	10	3	0	2	2	0

Рис. 1. Скрининг штаммов *R. leguminosarum* на предмет наличия у них генов регулирующих биосинтез экзополисахаридов

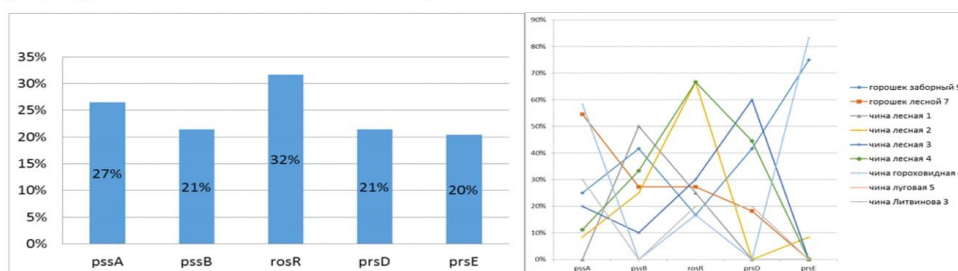


Рис. 2. Идентифицированные в штаммах *R. leguminosarum* гены экзополисахаридов

В результате скрининга штаммов ризобактерий нами были идентифицированы все исследуемые гены, однако, их наличие в штаммах не всегда было 100%. Оказалось, что в некоторых исследуемых штаммах гены могут не идентифицироваться. При этом в 15 штаммах мы не обнаружили ни одного из представленных генов. Такие штаммы характеризуются скудным ослизнением клеток. У некоторых штаммов *R.leguminosarum* гены *prsD* и *prsE* не были найдены. Это можно объяснить тем, что они являются вспомогательными генами. Большой процент из исследуемых генов составил *rosR*, т.к. он играет ключевую роль в регуляции синтеза ЭПС среди всех описанных регуляторных генов, функционируя как положительный регулятор этого процесса.

Регуляция биосинтеза ЭПС важна для установления симбиотических отношений с бобовыми растениями, питания, защиты от вредных факторов окружающей среды, формирования биопленок. Чем больше ризобии синтезируют ЭПС, тем выше их конкурентоспособность по сравнению с другими штаммами.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-00902А; №16-34-01076 мол_а; №17-44-020201р_а; РФФИ № 18-34-00033 мол_а.

Список использованной литературы

1. Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia //International journal of molecular sciences. – 2011. – Т. 12. – №. 11. – С. 7898-7933.
2. Rinaudi L. V., Giordano W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia //FEMS microbiology letters. – 2010. – Т. 304. – №. 1. – С. 1-11.
3. Skorupska A. et al. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions //Microbial cell factories. – 2006. – Т. 5. – №. 1. – С. 7.
4. Cheng H. P., Walker G. C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti* //Journal of bacteriology. – 1998. – Т. 180. – №. 19. – С. 5183-5191.
5. 4. Ivashina T.V., Khmelnsky M.I., Shlyapnikov M.G., Kanapin A.A., Ksenzenko V.N. // Gene. 1994. V. 150. P. 111–116.
6. . Janczarek M., Skorupska A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates //International journal of molecular sciences. – 2011. – Т. 12. – №. 6. – С. 4132-4155.
7. Janczarek, M.; Skorupska, A. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *pssB* gene product is an inositol monophosphatase that influences exopolysaccharide synthesis. Arch. Microbiol. 2001, 175, 143–151.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН
Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)

**Третья всероссийская молодёжная научная
школа-конференция с международным участием
«Микробные симбиозы в природных
и экспериментальных экосистемах»**

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

2-6 октября, 2017



Оренбург • 2017

Получение рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобияльных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP

Лавина А.М.¹, Нигматуллина Л.Р.¹, Аксюкова Е.Э.², Вершинина З.Р.¹, Баймиев А.Х.¹

¹Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, Россия

²Башкирский Государственный Медицинский Университет, Уфа, Россия
owlwoman@mail.ru

Прикрепление почвенных бактерий к растительным клеткам является одним из самых ранних этапов взаимодействия симбионтов в сложном специфическом инфекционном процессе, необходимом для растительно-микробных взаимодействий. Первой фазой прикрепления является обратимое и неспецифическое связывание, в котором участвуют внеклеточные полисахариды или экзополисахариды (EPS), синтезируемые азотфиксирующими бактериями. Такое прикрепление представляет собой начальный этап формирования ризобиями биопленок на корнях растений.

Для исследования генов, ответственных за синтез экзополисахаридов, в рамках их воздействия на формирование биопленок ризобиями, в частности в искусственных симбиотических системах, где большую роль играет колонизация корней растений, необходима визуализация взаимодействия азотфиксирующих бактерий с корнями растений. В виду этого целью данного исследования было создание генно-инженерных конструкций, содержащих ген флуоресцентного белка GFP, а также гены регулирующие синтез экзополисахаридов. В рамках данного исследования нами были выбраны гены, ответственные за инициацию биосинтеза (*pssA*) и регуляцию транскрипции (*rosR*) экзополисахаридов.

Для визуализации взаимодействия ризобий с корнями растений, нами была получена генно-инженерная конструкция с зеленым флуоресцентным белком GFP. Так целевой ген GFP был амплифицирован из вектора pJN105TurboGFP. Для того чтобы обеспечить конститутивную экспрессию зеленого флуоресцентного белка, данный ген был амплифицирован вместе с промотором фага T5 при помощи специфичных праймеров, содержащих сайт рестрикции HindIII. Далее амплифицированную последовательность ДНК клонировали в промежуточный вектор pAL-2T. Затем из плазмиды pAL-2T с помощью рестриктазы HindIII была вырезана последовательность ДНК, содержащая конститутивный промотор фага T5 и ген GFP. После этого последовательность ДНК была клонирована в вектор pJB658 по сайту рестрикции HindIII. Так был получен вектор pJB658GFP. Данный вектор использовался для создания плазмидных конструкций с генами *pssA* и *rosR*. Для этого гены *pssA* и *rosR* были амплифицированы, с помощью специфичных праймеров с сайтами рестрикции NdeI, фланкирующих структурную часть генов. Данные полученные при секвенировании исследуемых последовательностей подтвердили их идентичность с последовательностями, представленными в GenBank. Так гены *pssA* и *rosR* были клонированы в промежуточный вектор pAL-2T, а затем в вектор pJB658GFP под индуцибельным промотором Pm. Далее данными конструкциями были трансформированы ризобияльные штаммы.

Таким образом были получены штамм *Rhizobium leguminosarum* VCr7 pJB658GFP+*pssA* и штамм *R. leguminosarum* VSy3 pJB658GFP+*rosR*, которые характеризуются большей наработкой экзополисахаридов, что выражается наибольшим ослизнением азотфиксирующих бактерий. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ-мол_а № 16-34-01076, РФФИ-Инициативный № 16-04-00902А.



Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Аксюкова Е.Э.
Факультет, кафедра, номер группы	Б-401А
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	Микроскопическое исследование структуры биопленок, образуемых бактериями Rhizobium leguminosarum
Название файла	Микроскопическое исследование структуры биопленок, образуемых бактериями Rhizobium leguminosarum.docx
Процент заимствования	22,00%
Процент цитирования	1,04%
Процент оригинальности	76,96%
Дата проверки	13:54:17 22 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"

Работу проверил Кобзева Наталья Рудольфовна
ФИО проверяющего

Дата подписи

22.06.2018г.

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

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.

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Отзыв научного руководителя на выпускную квалификационную работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

Аксюковой Екатерины Эдуардовны

на тему:

«МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОПЛЕНОК,
ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM»

Дипломная работа Аксюковой Екатерины Эдуардовны посвящена исследованию биопленок диких и рекомбинантных по генам *pssA*, *rosR* и *rapA*, штаммов ризобактерий.

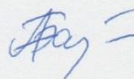
Аксюкова Е.Э. проходила дипломную практику в лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УФИЦ РАН. За время прохождения практики показала себя ответственным, исполнительным, инициативным исследователем. В процессе работы над дипломной работой Аксюкова Е.Э. изучила литературные источники по проблеме за последние 10 лет. Она имеет хорошую теоретическую подготовку, владеет основными микробиологическими и молекулярно-биологическими методами исследований. Работа Аксюковой Е.Э. прошла апробацию на 83-й Всероссийской научной конференции БашГМУ.

Используемый в работе подход способствует пониманию молекулярных механизмов формирования процесса образования бактериями биопленок и позволил оценить структуры биопленок, образованных исследуемыми ризобияльными штаммами. Полученные результаты, могут быть использованы при дальнейшем изучении механизмов формирования биоплёнок штаммами бактерий и помогут, в том числе, в разработке подходов к лечению многих опасных инфекций.

«Работа допускается к защите»

Научный руководитель:
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России

18 июня 2018 г.



Ал.Х. Баймиев

ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук, профессора Максимова Игоря Владимировича на выпускную квалификационную работу Аксюковой Екатерины Эдуардовны «Микроскопическое исследование структуры биопленок, образуемых бактериями *Rhizobium leguminosarum*»

Актуальность темы исследования.

Работа Аксюковой Е.Э. посвящена проблеме изучения молекулярных механизмов образования клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* особых структур – биопленок - на разных поверхностях. Тема актуальна, поскольку формирующиеся по схожему механизму бактериальные биопленки очень широко распространены в природе. В том числе, биопленки, формируемые болезнетворными микроорганизмами, делают их устойчивыми к действию антибиотиков, способствуют переходу инфекции в хроническую форму.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Аксюкова Е.Э. в своей работе оценила влияние гиперэкспрессии генов-регуляторов путей синтеза экзополисахаридов *pssA*, *rosR* и адгезина *rapA1*, на формирование ризобиями биопленок. Показано, что исследуемые гены усиливают образование данных структур. Следовательно, изменяя регуляцию генов бактерий можно усиливать/ослаблять биопленкообразование, что можно использовать при создании микроудобрений для растений, разработке подходов к лечению многих опасных инфекций и т.д.

Достоверность и апробация результатов исследования.

В работе использованы адекватные методы работы с микроорганизмами. Проведена статистическая обработка полученных данных. Достоверность результатов не вызывает сомнений. Работа Аксюковой Е.Э. прошла апробацию на 83-й Всероссийской научной конференции БашГУМУ.

Оценка содержания, завершенности и оформления ВКР.

Работа Аксюковой Е.Э. написана хорошим научным языком и представляет небольшой, но цельный завершенный труд. Состоит из классических разделов, хорошо структурирована и оформлена. Обзор литературы достаточен для оценки состояния изучаемой проблемы. Примененные методы детально описаны. Результаты работы подробно описаны и обсуждены. В конце работы присутствует краткое заключение. Прилагается список цитированной литературы.

Соответствие направлению подготовки.

Работа полностью соответствует паспорту специальности – Биология (03.02.03 – микробиология).

Заключение. Таким образом, выпускная квалификационная работа Аксюковой Екатерины Эдуардовны «Микроскопическое исследование структуры биопленок, образуемых бактериями *Rhizobium leguminosarum*», выполненная под руководством доктора биологических наук Баймиева Алексея Ханифовича является завершенной и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01. – Биология (бакалавриат).

Доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии иммунитета Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН) (Адрес: Уфа, Проспект Октября, 71. Тел.: (347) 235-61-00; Факс: 235-60-88; E-mail: phyto@anrb.ru)



Игорь Владимирович Максимов

Максимов И.В. - доктор,
заведующий структурного подразделения
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра
Российской академии наук

Ф.Р. Гуляпов

Доклад к защите дипломной работы Аксюковой Е. Э.

[1 слайд]

Уважаемые председатель и члены государственной экзаменационной комиссии, разрешите представить Вам доклад на тему:

«МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*»

[2 слайд]

Биопленки представляют собой бактериальные сообщества, состоящие из клеток, которые прикреплены к поверхности или друг к другу и заключены в матрикс, синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, демонстрирующие измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфических генов.

[3 слайд]

В настоящее время считается общепринятым представление о том, что развитие биопленочных сообществ - одна из основных стратегий выживания микроорганизмов не только в окружающей среде, но и в организме человека и животных. Связано это с тем, что, биопленки являются одним из патогенетических факторов формирования хронических инфекционных процессов. В первую очередь это касается заболеваний, связанных с использованием имплантируемых устройств (катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца). С биопленочными инфекциями также связаны многие хронические заболевания - муковисцидозная пневмония, средний отит, остеомиелит, патология зубов и околозубных тканей, инфекции мочевыводящих путей. Именно биопленочные сообщества проявляют значительно более высокую устойчивость – до 1000 раз - к антибиотикам и другим лекарственным препаратам, что крайне затрудняет борьбу с инфекциями, вызванными различными патогенными бактериями.

Данный факт подчеркивает важность изучения образования биопленок. В рамках данного исследования мы изучали образование биопленок на примере бактерий рода *Rhizobium*.

[4 слайд]

Почвенные бактерии рода *Rhizobium* являются наиболее важными и перспективными среди ассоциативных ризобактерий. Их представители - это азотфиксирующие микроорганизмы, способные вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями, и образовывать биопленки во время колонизации корней растений.

Существует множество исследований, посвященных способности почвенных микроорганизмов колонизировать корневую систему растений и образовывать биопленки, но тем не менее, до сих пор не представлено комплексного взгляда на образование биопленок, связанного с определением экспрессии генов, ответственных за различные стадии развития биопленок и их регуляцию.

[5 слайд]

В виду этого целью данного исследования являлось: «Изучение структуры биопленок, образуемых дикими и рекомбинантными по генам регуляции синтеза экзополисахаридов *pssA*, *rosR* и адгезина *rapA1*, штаммами бактерий рода *Rhizobium*».

[6 слайд]

В связи с поставленной целью были определены следующие задачи:

1. Проведение микроскопического исследования структур биопленок, образуемых ризобияльными штаммами дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702.
2. Проведение микроскопического исследования структур биопленок, образуемых исследуемыми штаммами ризобий с измененной экспрессией генов *rapA1*, *pssA* и *rosR*.
3. Построение кривой роста и размножения клеток, исследуемых ризобияльных штаммов дикого типа и рекомбинантных по генам *rapA1*, *pssA*, *rosR*.

[7 слайд]

Материалы и методы

В рамках работы по проведению исследования микроскопических структур биопленок, использовались ризобияльные штаммы из рабочей коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: *R.leguminosarum* PVu5, *R.leguminosarum* THy2, *R.leguminosarum* TPr4, *R.leguminosarum* VSy12, *R.galegae* 0702 дикого типа и ризобии с измененной экспрессией генов, участвующих в биосинтезе экзополисахаридов (гены *pssA* и *rosR*), а также с геном *rapA1*, ответственным за агглютинацию бактерий.

[8 слайд]

Нами были проведены детальные микроскопические исследования структур биопленок. Для этого жидкую культуру ризобактерий выращивали в течении 2-х суток в стеклянных колбах в жидкой среде УМ на шейкере при 28°C и 140 об./мин. до концентрации 10^8 КОЕ/мл. Затем пипеткой отбирали 10 мкл. жидкой культуры, разбавляли 1:10 в свежей среде УМ и помещали в одну из лунок 96-луночного пластикового планшета (из полистерола). Планшеты герметизировали парафильмом и инкубировали при 28°C и 140 об./мин. в течение 7 суток. После инкубации с помощью пипетки удаляли питательную среду и планктонные клетки. Проводили окрашивание по методу Грама и микроскопировали с использованием светового микроскопа.

Также нами была проведена оценка зависимости числа живых клеток от времени, при росте культур на несменяемой среде. Для этого строили кривую роста микроорганизмов, представленную в виде логарифма. Проводили измерения необходимые для описания лаг-фазы, экспоненциальной фазы и стационарной фазы роста. Измерения прекращали после 48 часов инкубирования, в виду того что после 2-х суток у ризобий продолжается стационарная фаза, за которой следует фаза отмирания клеток. Так исследуемые ризобактерии выращивали в жидкой среде УМ в стеклянных колбах на шейкере при 28°C и 140 об./мин. в течение 1, 4, 16, 24 и 48 часов.

[9 слайд]

Результаты и их обсуждения

В случае разновидностей штамма *R. leguminosarum* PVu5 мы выяснили, что рост клеток рекомбинантных штаммов происходит интенсивнее по сравнению с диким штаммом. Наибольшее количество клеток мы наблюдали в случае измерения штаммов *R. leguminosarum* PVu5 *rapA1* и *R. leguminosarum* PVu5 *rosR*. Примечательным оказался тот факт, что те же штаммы образовывали более сложные структуры биопленок, при этом все разновидности штамма склонны формировать биопленки. Несмотря на то, что биопленка образуемая штаммом *R. leguminosarum* PVu5 *pssA* по отношению к биопленке штамма *R. leguminosarum* PVu5 имела более сложную структуру (имелось большее количество выстроенных тяжей), на препарате с этим штаммом присутствовало небольшое количество единичных планктонных клеток. Это может указывать на незрелость биопленки и возможное продолжение ее развития, так как произошла адгезия

единичных клеток на поверхности полистероловой лунки – один из начальных этапов формирования биопленок.

[10 слайд]

При микроскопировании разновидностей штамма *R. leguminosarum* THy2 биопленки наблюдались во всех случаях. Наибольшего развития достигла биопленка, образуемая штаммом *R. leguminosarum* THy2 *rapA1*, несмотря на то, что после 2-х суточных измерений показатель количества клеток данной культуры был незначительно ниже штамма дикого типа и сильно отставал от показателей штаммов *R. leguminosarum* THy2 *pssA* и *rosR*. Эти штаммы показали схожие результаты прироста клеток и степени образования биопленок.

[11 слайд]

Значения измерений количества клеток рекомбинантных разновидностей штамма *R. leguminosarum* TPr4 было примерно одинаковым и оказалось значительно выше штамма дикого типа. Несмотря на это биопленка, формируемая штаммом *R. leguminosarum* TPr4 дикого типа, находилась на более старшей стадии развития по отношению к биопленкам штаммом *R. leguminosarum* TPr4 *pssA* и *R. leguminosarum* TPr4 *rosR*. Наиболее быстрый рост клеток показал штамм *R. leguminosarum* TPr4 *rapA1*, в отношении которого мы наблюдали самую зрелую биопленку из всех изученных.

[12 слайд]

Далее были проанализированы значения разновидностей штамма *R. leguminosarum* VSy12. Показатели штамма дикого типа в лаг-фазе, экспоненциальной фазе и фазе стационарного роста оказались выше некоторых показателей рекомбинантных штаммов. Однако при микрокопировании, именно в отношении данного штамма, встречалось самое большое количество единичных клеток, возможно это связано с тем, что для образования зрелой биопленки штамму *R. leguminosarum* VSy12 необходимо больше времени. В стационарной фазе наименьшее количество клеток показал штамм *R. leguminosarum* VSy12 *rapA1*, однако в его случае мы наблюдали образованную биопленку. Самая зрелая биопленка была у штамма *R. leguminosarum* VSy12 *pssA*.

[13 слайд]

Наивысшие средние показатели числа живых клеток от времени мы отметили у разновидностей штамма *R. galegae* 0702, причем как у штамма дикого типа, так и у рекомбинантных штаммов. Такой быстрый рост клеток сказался и на образовании биопленок, так как наиболее зрелые биопленки мы также отметили в этом случае. Несмотря на то, что гены *pssA* и *rosR* участвуют в биосинтезе экзополисахаридов у штаммов вида *R. leguminosarum*, при микроскопировании биопленок штаммов *R. galegae* 0702 с геном *pssA* или *rosR*, мы наблюдали зрелую биопленку, более сложной архитектуры по сравнению с биопленкой штамма дикого типа. Это указывает на то, что данные гены могут работать у родственных штаммов и положительно влиять на их биопленкообразование и выживаемость в целом.

[14 слайд]

Выводы:

1. Проведено детальное микроскопическое исследование структур биопленок, образуемых ризобияльными штаммами дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702. Подтверждено, что исследованные штаммы ризобий способны к формированию биопленок.
2. Проведено детальное микроскопическое исследование структур биопленок, образуемых исследуемыми штаммами ризобий с измененной экспрессией по генам *gapA1*, *pssA* и *rosR*. Показано, что все они образуют биопленки на стерильных инертных поверхностях, в том числе и на полистироле. Обнаружено, что рекомбинантные штаммы ризобий по сравнению с дикими штаммами формируют более сложные архитектурные структуры биопленок.
3. Построены наглядные графики кривой роста и размножения клеток, исследуемых ризобияльных штаммов дикого типа и рекомбинантных по генам *gapA1*, *pssA*, *rosR*. Исходя из чего, было выявлено, что высокие показатели числа живых клеток от времени далеко не всегда указывают на способность штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

[15 слайд]

Достижения и публикации.



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Аксюкова Екатерина Эдуардовна

«МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*»

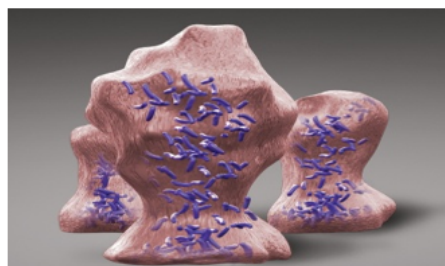
Научный руководитель: д.б.н., доцент Ал. Х. Баймиев

● Уфа 2018 ●



АКТУАЛЬНОСТЬ

Биопленки – это бактериальные сообщества, состоящие из клеток, которые прикреплены к поверхности или друг к другу и заключены в матрикс, синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, демонстрирующие измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфичных генов



Бактериальная биопленка



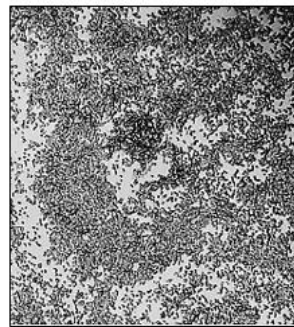
ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНК ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ



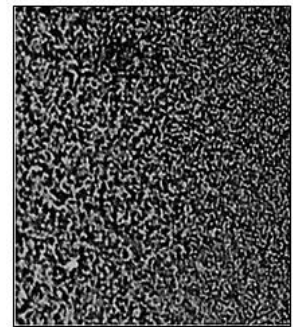
а



б



в



г

Формирование биопленок бактериями: а – *Y. enterocolitica*; б – *E. Coli*; в – *P. Aeruginosa*; г – *S. Aureus*

3



РИЗОБАКТЕРИИ

Бактерии рода *Rhizobium* - это азотфиксирующие микроорганизмы, способные вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями и образовывать биопленки во время колонизации корней растений



Rhizobiaceae формирующие азотфиксирующие корневые клубеньки на корнях бобовых растений

4



ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроскопическое исследование структуры биопленок, образуемых дикими и рекомбинантными по генам регуляции синтеза экзополисахаридов *pssA*, *rosR* и адгезина *rapA1*, штаммами бактерий рода *Rhizobium*

5



ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Проведение микроскопического исследования структур биопленок, образуемых ризобияльными штаммами дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702;
2. Проведение микроскопического исследования структур биопленок, образуемых исследуемыми штаммами ризобий с измененной экспрессией генов *rapA1*, *pssA* и *rosR*;
3. Построение кривой роста и размножения клеток, исследуемых ризобияльных штаммов дикого типа и рекомбинантных по генам *rapA1*, *pssA*, *rosR*.

6



ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дикий штамм	Рекомбинантный штамм
<i>R. leguminosarum</i> PVu5	<i>R. leguminosarum</i> PVu5 <i>RapA1</i>
	<i>R. leguminosarum</i> PVu5 <i>PssA</i>
	<i>R. leguminosarum</i> PVu5 <i>RosR</i>
<i>R. leguminosarum</i> THy2	<i>R. leguminosarum</i> THy2 <i>RapA1</i>
	<i>R. leguminosarum</i> THy2 <i>PssA</i>
	<i>R. leguminosarum</i> THy2 <i>RosR</i>
<i>R. leguminosarum</i> TPr4	<i>R. leguminosarum</i> TPr4 <i>RapA1</i>
	<i>R. leguminosarum</i> TPr4 <i>PssA</i>
	<i>R. leguminosarum</i> TPr4 <i>RosR</i>
<i>R. leguminosarum</i> VSy12	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 <i>RapA1</i>
	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 <i>PssA</i>
	<i>R. leguminosarum</i> VSy12 <i>RosR</i>
<i>R. galegae</i> 0702	<i>R. galegae</i> 0702 <i>RapA1</i>
	<i>R. galegae</i> 0702 <i>PssA</i>
	<i>R. galegae</i> 0702 <i>RosR</i>

7



МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



Шейкер-инкубатор ES-20



Планшет полистироловый с крышкой для (96 лунок с U-образным дном)



Спектрофотометр BioRad SmartSpec Plus

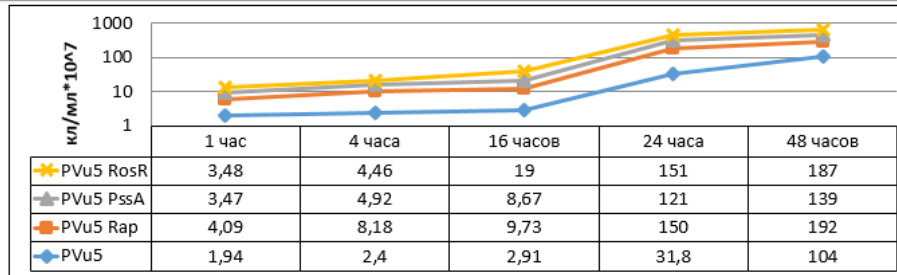


Микроскоп Biozero BZ-8100 (Keyence)

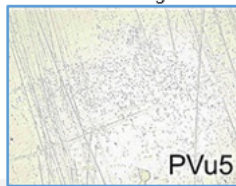
8



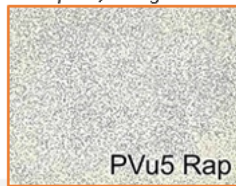
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ ШТАММ *R. LEGUMINOSARUM* PVU5



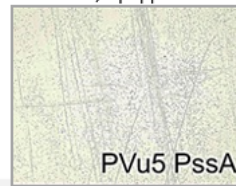
Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* PVu5 (дикий тип), *R. leguminosarum* PVu5 rapA1, *R. leguminosarum* PVu5 pssA, *R. leguminosarum* PVu5 rosR, представленная в виде логарифма



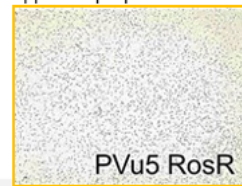
PVu5



PVu5 Rap



PVu5 PssA



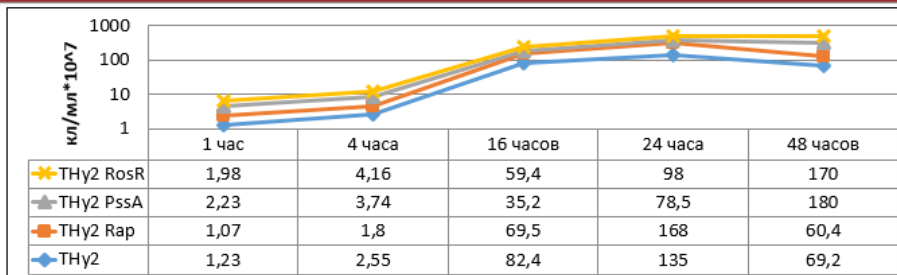
PVu5 RosR

Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* PVu5 за 7 суток

9



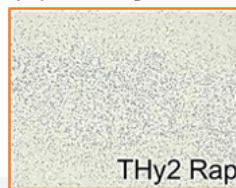
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ ШТАММ *R. LEGUMINOSARUM* THY2



Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* THy2 (дикий тип), *R. leguminosarum* THy2 rapA1, *R. leguminosarum* THy2 pssA, *R. leguminosarum* THy2 rosR, представленная в виде логарифма



THy2



THy2 Rap



THy2 PssA



THy2 RosR

Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* THy2 за 7 суток

10



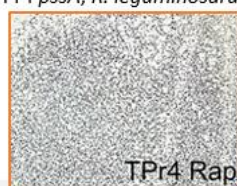
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ ШТАММ *R. LEGUMINOSARUM* TPr4



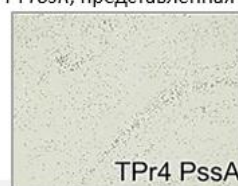
Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* TPr4 (дикий тип), *R. leguminosarum* TPr4 rapA1, *R. leguminosarum* TPr4 pssA, *R. leguminosarum* TPr4 rosR, представленная в виде логарифма



TPr4



TPr4 Rap



TPr4 PssA



TPr4 RosR

Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* TPr4 за 7 суток

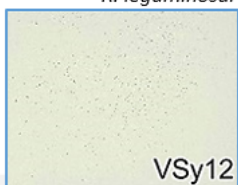
11



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ ШТАММ *R. LEGUMINOSARUM* VSy12



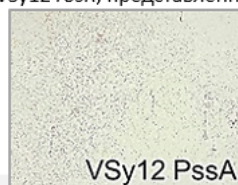
Кривая роста и размножения штаммов *R. leguminosarum* VSy12 (дикий тип), *R. leguminosarum* VSy12 rapA1, *R. leguminosarum* VSy12 pssA, *R. leguminosarum* VSy12 rosR, представленная в виде логарифма.



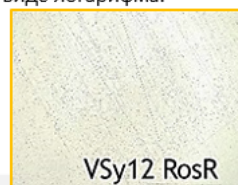
VSy12



VSy12 Rap



VSy12 PssA



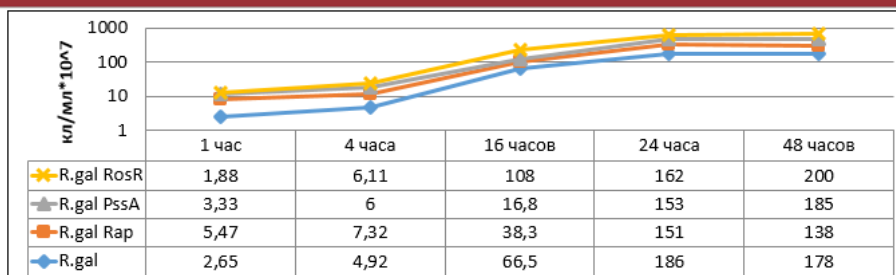
VSy12 RosR

Биопленка, образованная штаммом *R. leguminosarum* VSy12 за 7 суток.

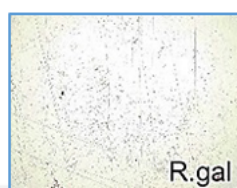
12



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ ШТАММ *R. GALEGAE* 0702



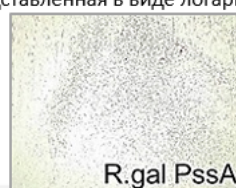
Кривая роста и размножения штаммов *R. galegae* 0702 (дикий тип), *R. galegae* 0702 rapA1, *R. galegae* 0702 VSy12 pssA, *R. galegae* 0702 rosR, представленная в виде логарифма



R.gal



R.gal Rap



R.gal PssA



R.gal RosR

Биопленка, образованная штаммом *R. galegae* 0702 за 7 суток

13



ВЫВОДЫ

1. Проведено детальное микроскопическое исследование структур биопленок, образуемых ризобиями штаммами дикого типа: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. galegae* 0702. Подтверждено, что исследованные штаммы ризобий способны к формированию биопленок.

2. Проведено детальное микроскопическое исследование структур биопленок, образуемых исследуемыми штаммами ризобий с измененной экспрессией по генам rapA1, pssA и rosR. Показано, что все они образуют биопленки на стерильных инертных поверхностях, в том числе и на полистироле. Обнаружено, что рекомбинантные штаммы ризобий по сравнению с дикими штаммами формируют более сложные архитектурные структуры биопленок.

3. Построены наглядные графики кривой роста и размножения клеток, исследуемых ризобиями штаммов дикого типа и рекомбинантных по генам rapA1, pssA, rosR. Исходя из чего, было выявлено, что высокие показатели числа живых клеток от времени далеко не всегда указывают на способность штамма к быстрому образованию зрелой биопленки.

14



ДОСТИЖЕНИЯ И ПУБЛИКАЦИИ



БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
СЕРТИФИКАТ
Участника (ов) Аксюкова Е.Э., Аздерханова Г.С., Лавина А.М.
научной конференции «83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2018). С. 1201-1205.



БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ДИПЛОМ
Выдан студенту Аксюкову Е.Э.
Факультета Медицины
Специальность 06.03.01 - Лечебное дело
Среднего профессионального образования
«Медицина»
г. Уфа, 13 июня 2018 г.



Сертификат
Аксюкова Екатерина Захаровна
принял(а) участие в работе школы-семинара
HTSDD-2018
High throughput screening in drug discovery
состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа
в рамках государственного контракта РНФ «Новый рациональный подход к разработке антибактериальных и противовирусных лекарственных молекул с применением технологий ВПС»
Председатель программного комитета
А.С.М. Рамазанов В.А. Аздерханов

1.Аксюкова Е.Э., Аздерханова Г.С., Лавина А.М. Микроскопическое исследование структуры биопленок, образуемых бактериями рода Rhizobium. Вестник БГМУ: Сборник материалов 83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2018). С. 1201-1205.

2.Аздерханова Г.С., Аксюкова Е.Э., Лавина А.М. Идентификация генов, регулирующих биосинтез экзополисахаридов у бактерий рода Rhizobium. Вестник БГМУ: Сборник материалов 83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2018). С. 1188-1192.

3.Лавина А.М., Нигматуллина Л.Р., Аксюкова Е.Э., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Получение рекомбинантных по генам pssA и rosR ризобияльных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP. Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН и Оренбургский научный центр УрО РАН: Сборник тезисов III Всероссийской молодежной научной школы-конференции с международным участием «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2017). С. 20.