

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е.И. Шишацкая
«_____» _____ 20__ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Сравнительная оценка различных методов идентификации непатогенных
бактерий

Научный руководитель _____ доцент, к.б.н. О.А. Гусейнов
Выпускник _____ К.А. Бурдукова

Красноярск 2021

Оглавление

Реферат	3
Введение.....	4
1 Обзор литературы	5
1.1 Роль микроорганизмов в жизни людей.....	5
1.2 Роль микроорганизмов при заболеваниях	6
1.3 Роль микроорганизмов для здоровья человека	8
1.4 История развития методов идентификации микроорганизмов.....	11
1.5 Классификация методов идентификации микроорганизмов.....	14
1.6 Современные методы идентификации бактерий	15
1.7 Метод масс-спектрометрии.....	19
1.8 Генетические методы	22
1.9 Метод ARDRA	25
2 Материалы и методы	27
2.1 Объекты	27
2.2 Методика анализа <i>in silico</i>	27
2.2 Метод получения чистой культуры.....	27
2.3 Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду	28
2.4 Методика выделения ДНК	29
2.5 Методика проведения полимеразной цепной реакции.....	30
2.6 Методика проведения электрофореза	30
2.7 Проведение реакции рестрикции.....	32
3 Результаты и обсуждение.....	33
3.1 Результаты получения чистых культур бактерий.....	33
3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий.....	33
3.2 Получение ампликонов гена 16S рРНК	36
3.3 Результаты реакций рестрикции	37
3.4 Результаты анализа <i>in silico</i>	38
3.5 Сравнение теоретических и практических электрофореграмм.....	40
Заключение	45
Список использованных источников	46

Реферат

Бакалаврская работа по теме «Сравнительная оценка различных методов идентификации непатогенных бактерий» содержит 50 страниц текстового документа, 12 иллюстраций, 4 таблицы, 41 использованный источник.

Ключевые слова: микрофлора, ARDRA, ген 16S рРНК.

Цель данной работы: изучить и сравнить методы идентификации микроорганизмов, определить вид полученных образцов бактерий. На основании поставленной цели определены следующие задачи:

1. Выделить чистые культуры из образцов смешанных культур бактерий и выделить ДНК из биомассы чистых культур.
2. Получить ампликоны гена 16S рРНК и провести рестрикционный анализ этих ампликонов.
3. Провести анализ *in silico* предполагаемых видов бактерий с использованием данных GenBank.
4. Сравнить теоретические и экспериментальные электрофореграммы и идентифицировать бактерии.
5. Проверить достоверность идентификации полученных нами чистых культур микроорганизмов методом MALDI-TOF.

В современной биотехнологии широко используются свойства микроорганизмов. В то же время микроорганизмы, обладающие полезными для человека свойствами, могут иметь и патогенные свойства. Поэтому, перед тем как начать использовать новые организмы, очень важно их правильно идентифицировать. Наравне с традиционными методами идентификации микроорганизмов, в последнее время повсеместно используют методы определения, связанные с изучением ДНК микроорганизмов, которая является важнейшим объектом исследований в молекулярной биологии и биохимии.

Введение

В современной биотехнологии широко используются свойства микроорганизмов. В то же время микроорганизмы, обладающие полезными для человека свойствами, могут иметь и патогенные свойства. Поэтому, перед тем как начать использовать новые организмы, очень важно их правильно идентифицировать. Наравне с традиционными методами идентификации микроорганизмов, в последнее время повсеместно используют методы определения, связанные с изучением ДНК микроорганизмов, которая является важнейшим объектом исследований в молекулярной биологии и биохимии.

Цель работы: Изучить и сравнить методы идентификации микроорганизмов, определить вид полученных образцов бактерий.

Задачи:

1. Выделить чистые культуры из образцов смешанных культур бактерий и выделить ДНК из биомассы чистых культур.
2. Получить ампликоны гена 16S рРНК и провести рестрикционный анализ этих ампликонов.
3. Провести анализ *in silico* предполагаемых видов бактерий с использованием данных GenBank.
4. Сравнить теоретические и экспериментальные электрофореграммы и идентифицировать бактерии.
5. Проверить достоверность идентификации полученных нами чистых культур микроорганизмов методом MALDI-TOF.

1 Обзор литературы

1.1 Роль микроорганизмов в жизни людей

В настоящее время, при рассмотрении микроорганизмов различными авторами, под данным термином часто подразумевают бактерии. Бактерии - прокариотические микроорганизмы, их размеры не превышают нескольких микрометров [1].

Отличительным свойством прокариотических клеток является отсутствие ядра, а также представление генетического материала в виде двойной кольцевой спирали. При этом в отличие от эукариотных организмов, ДНК прокариот не содержит интронов. Однако важно отметить, что за редким исключением встречаются прокариотические микроорганизмы и с интронами, но крайне нечасто [2].

Представители домена *Bacteria* являются одними из древнейших живых организмов на планете Земля. На Земле бактерии обитают повсеместно. Они нередко могут выступать как симбионты или паразиты для представителей других царств, в частности, животных, куда также входит и человек.

На данный момент известна лишь малая часть всех существующих бактерий на Земле. Царство *Bacteria* является одним из наиболее разнообразных и включает в себя миллионы и миллиарды видов.

Бактерии способны питаться органическими веществами, способствуя тем самым их разложению. Такие бактерии являются органотрофами. Они запускают процесс разложения, участвуют в процессе фиксирования атмосферного азота. Кроме того, существуют бактерии фототрофы – питающиеся за счет энергии солнца, и литотрофы – получающие энергию за счет переработки неорганических веществ. Бактерии могут выживать в экстремальных условиях, даже на дне Марианской впадины [1].

Бактерии, благодаря своей деятельности, осуществляют минерализацию органических остатков. Это обеспечивает непрерывное поступление в атмосферу углекислого газа, без которого невозможен фотосинтез. Также бактерии принимают активное участие в различных геологических

видоизменениях, благодаря чему формируется почва, образуются различные руды, нефть, каменный уголь и многое другое.

Относительно человека бактерии обитают в желудочно-кишечном тракте, для того, чтобы завершать переваривание питательных веществ, на коже, предохраняя ее поверхность, а также играют важнейшую роль в формировании иммунитета. Многие микроорганизмы, которые обитают в кишечнике, являются антагонистами различных болезнетворных бактерий, а также вырабатывают витамины, необходимые организму человека или животного [3].

1.2 Роль микроорганизмов при заболеваниях

Немалое количество бактерий, которые эволюционно поселились в организме человека или животных, составляют нормальную микрофлору и относятся к условно-патогенным или непатогенным.

Ранее всех представителей нормальной микрофлоры считали безвредными для организма человека или животных, поэтому уделяли на изучение меньше времени, отдавая предпочтение исследованию патогенной микрофлоры [4].

Бактерии патогенной природы становятся причиной тяжелейших заболеваний человека и животных. Например - бубонная чума, столбняк, гонорея, туберкулез — все эти болезни имеют бактериальную природу.

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* входят в состав нормальной микрофлоры и не являются патогенными, однако при определенных условиях способны вызывать воспалительные процессы в организме.

Помимо воспалительных процессов некоторые представители нормальной микрофлоры могут благоприятствовать развитию бактериемии и сепсиса. Непатогенные и условно-патогенные микроорганизмы могут вызвать развитие бактериального шока на фоне массовой бактериемии, наступившей вследствие хронической очаговой инфекции. Чаще всего бактериальный шок имеет место быть при инфекциях в мочеполовой системе, а также при

переливании крови, которая может содержать микроорганизмы, и лекарственных препаратов больным различными заболеваниями.

Высокая степень тяжести бактериального шока возникает вследствие инфекций, вызванных бактериями рода *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*. В период ослабления иммунитета микроорганизмы, являющиеся постоянными обитателями верхних дыхательных путей, могут вызывать различные виды бронхитов и пневмоний, поражая при этом и нижние отделы дыхательных путей [5].

Нормальную микрофлору мочеполовой системы составляют такие бактерии, как *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* и различные виды *Klebsiella*. Перечисленные микроорганизмы также могут стать возбудителями воспалительных заболеваний (уретриты, циститы), заболеваний матки и предстательной железы при определенных условиях.

Всем известно, что представители рода *Staphylococcus* встречаются в больничных учреждениях повсеместно и вызывают гнойную инфекцию с многообразием клинических проявлений в 80% случаев. Чаще всего стафилококки становятся возбудителями инфекционных заболеваний дыхательных путей.

Просматривая статистику заболеваний за последние два десятка лет, можно увидеть, как увеличился процент инфекций, возбудителями которых становятся представители грамположительной и грамотрицательной палочковидной микрофлоры [6].

Escherichia coli – постоянный обитатель кишечника – при снижении иммунной защиты может вызвать у человека воспалительные заболевания брюшной полости (энтерит, перитонит и др). Для детей грудного возраста эти заболевания очень опасны и могут привести к серьезным осложнениям.

Bacillus Subtilis и *Bacillus Mesentericus* способны вызывать гнойно-воспалительные процессы при нарушении целостности кожи и слизистых, а также при попадании в различные органы. Эти микроорганизмы

обнаруживаются при обследовании больных с кишечной инфекцией, остеомиелитом, при гнойно-септических осложнениях после хирургических вмешательств, при заболеваниях по части урологии и травматологии [5].

Pseudomonas aeruginosa является самым частым возбудителем гнойно-воспалительных процессов среди грамотрицательных микроорганизмов.

Анализируя многочисленные наблюдения за больными, можно увидеть, что различные виды микроорганизмов вызывают гнойные осложнения и чаще всего представляют опасность для жизни людей. Воспалительная реакция в ответ на присутствие микроорганизмов приводит к нарушению транспорта биологических жидкостей в тканях, вследствие чего развивается гипоксия, а затем некроз тканей, вызванный накоплением токсических продуктов микроорганизмов [7].

1.3 Роль микроорганизмов для здоровья человека

Как упоминалось ранее, в организме человека существует большое количество микроорганизмов непатогенной или условно-патогенной природы. Микрофлора человека — это совокупность множества микроорганизмов, которая находится с нами в симбиотических отношениях, занимает ниши на коже и слизистых оболочках. Наиболее распространенное место обитания бактерий в организме человека является желудочно-кишечный тракт. В ЖКТ микроорганизмы выполняют различные функции по перевариванию пищи, брожению, синтезу витамина В и помощи в его усваивании и т.д. [8].

Микрофлора, которая населяет организм человека или животного, в биотопе находится или в свободном состоянии, или формируя некую биоплёнку. Некоторая часть микрофлоры отслаивается с поверхности биоплёнки и с выделениями человека попадает в окружающую среду.

Что же такое биоплёнка? Это форма организации микрофлоры в организме человека, которая представляет собой взаимодействующее сообщество микроорганизмов. В состав входят бактерии одного вида или нескольких. Сообщество формирует одну генетическую систему, которая организует «поведение» для всех членов биоплёнки. Это «поведение»

определяет пищевые, энергетические и другие связи для всех находящихся в сообществе бактерий между собой и внешним миром. Да, у бактерий давно появилось так называемое «социальное поведение микроорганизмов» [9].

Симбиотические взаимоотношения между организмом хозяина и его микрофлорой предполагают наличие сложного и многогранного механизма, реализуемого на метаболическом, регуляторном, внутриклеточном и молекулярно-генетическом уровнях. Эти отношения являются жизненно важными как для человека, так и для заселяющих его организм бактерий.

Характер взаимодействия организма человека с его собственной, нормальной микрофлорой, определяет его гомеостаз и носит симбиотический характер. Микрофлора и макроорганизм оказываются взаимозависимыми друг от друга. Степень их взаимозависимости варьирует от нейтрализма до комменсализма и полного мутуализма, а также включает и такой вид межвидовых связей как паразитизм.

Во взаимоотношения с макроорганизмом в форме комменсализма чаще всего вступают стабилизирующие виды микроорганизмов, входящие в структуру микробиоценоза. Комменсалам принадлежит основная функция по обеспечению защиты макроорганизма от чужеродной микрофлоры.

Взаимодействуя с рецепторами клетки, комменсалы инициируют образование биопленки. При этом предотвращается заселение макроорганизма посторонними микроорганизмами. Комменсалы являются деструкторами многих химических веществ, поступающих через эндоплазматическую сеть на поверхность эпителиальных клеток, которые используют в качестве питательных субстратов.

Кроме того, микроорганизмы-комменсалы, являются резервуаром хромосомных и плазмидных генов. Огромный пул генетического материала и его изменчивость, а также высокая скорость размножения микробных клеток обуславливают колоссальные адаптационные возможности микрофлоры человека.

Реакция организма хозяина на многочисленные микроорганизмы, обитающие на его коже и слизистых, – важный компонент иммунологического гомеостаза. Комменсалы играют роль антигенного стимулятора иммунной системы, индуцируют образование антител, опсоинов, и тем самым поддерживают клеточный и гуморальный иммунитет человека. Установлено, что у безмикробных животных недоразвиты лимфоидные органы, снижено количество лейкоцитов, отсутствуют плазматические клетки в кишечнике, продуцирующие IgA. Кроме того, у этих же животных имеет место дефицит хемотаксических факторов, цитокинов, медиаторов воспаления, снижена активность естественных клеток-киллеров и фагоцитарная активность клеток ретикулоэндотелиальной системы.

Кроме того, доказано, что нормофлора стимулирует перистальтику кишечника, опорожнение желудка, оказывает влияние на эндокринную систему, кроветворение и т.д. [10].

В настоящее время накоплены многочисленные данные, свидетельствующие, что мутуалистическая микрофлора человека осуществляет биотрансформацию желчных кислот, холестерина, стероидных гормонов, лекарственных препаратов в различные метаболиты в процессе кишечно-печеночной рециркуляции.

Известна роль мутуалистической микрофлоры в продукции биологически активных соединений. Среди них – летучие жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная, изомасляная, изовалериановая), являющиеся главным продуктом микробной ферментации углеводов.

Помимо выполнения вышеперечисленных функций, мутуалисты участвуют в поддержании водно-солевого обмена, поддерживают pH, регулируют газовый обмен. Сопоставление состава содержимого кишечника обычных и безмикробных животных свидетельствует о том, что у последних отмечается повышенная гидратация кишечного содержимого, нарушена абсорбция Ca, Mg, P и других ионов и катионов [11].

Таким образом, можно сказать, что микрофлора человека играет одну из важнейших ролей организма в обеспечении его хорошей работоспособности и поддержании гомеостаза, сохранения и охране здоровья человеческого организма [12].

1.4 История развития методов идентификации микроорганизмов

История развития методов идентификации микроорганизмов непосредственно связана с развитием и становлением микробиологии как науки. В соответствии с ее развитием происходило также и усовершенствование методов идентификации бактерий.

Развитие микробиологии происходило в 5 этапов, каждый из которых подробно описан ниже [13].

Начало развития было положено в периоде, названном эврическим (IV-III века до н.э. - XVI век). На тот момент нельзя было доказать что-то экспериментальным путем, поэтому этот период связан больше с логическими и методическими приемами нахождения истины. Мыслители могли лишь высказывать различные предположения об этиологии заболеваний или о том, что существуют животные, не видимые привычным взглядом. Только в начале XVI века итальянский врач Джироламо Фракасторо высказал идею о живом контагии, который может вызывать заболевания. Эту гипотезу приняли и начали предохраняться ношением масок, обработкой предметов уксусом, а иногда и карантинными мероприятиями.

С открытия микроорганизмов А. Левенгуком начинается морфологический период, длившийся с XVII вв. по первую половину XIX вв. На данном этапе появились подтверждения повсеместного распространения микроорганизмов, были описаны две формы клеток, характер их движения и места обитания. Стали возможными данные открытия благодаря изобретению микроскопа.

Физиологический период (вторая половина XIX века) включает в себе бурное развитие микробиологии, которое привело к открытию многих микроорганизмов. В этом периоде, который по праву можно назвать

Пастеровским, произошли выдающиеся открытия в области микробиологии. Ученый Луи Пастер в своей научной деятельности охватил все основные проблемы жизнедеятельности микроорганизмов, стоящие на тот момент перед научным миром.

Иммунологический период (начало XX века) начался с открытий и научных работ Луи Пастера, связанных с вакцинацией. Затем период дополнился теорией гуморального иммунитета Пауля Эрлиха и изучением фагоцитоза Ильей Мечниковым.

Молекулярно-генетический период (с 50-х гг. XX века) начался с достижений генетики и молекулярной биологии. На бактериях ставили опыты, чтобы доказать роль ДНК в передаче наследственной информации, а стало это возможным благодаря созданию электронного микроскопа. Изучение бактерий, вирусов, а позднее плазмид, дало науке того периода глубокое понимание базисных процессов, лежащих в основе жизни. После выяснения принципов кодирования генетической информации в ДНК бактерий и установления универсальности генетического кода стали лучше понимать молекулярно-генетические закономерности, свойственные более высокоорганизованным организмам [14].

До сегодняшнего дня мы могли бы не увидеть микроорганизмы и не понять их природу, если бы не начало развития оптических приборов. Еще во времена Древнего Вавилона человек сделал первый шаг на пути в мир невидимых организмов: нашлось применение горному хрусталу, он использовался в качестве двояковыпуклых линз. Только спустя 16 веков Галилео Галилей создаст первый микроскоп.

Вскоре после изобретения микроскопа открылись новые возможности, которые позволили Антони ван Левенгуку впервые увидеть микроорганизмы в капле воды. Стимулом для дальнейших исследований, которые привели к возникновению микробиологии, стали три проблемы: этиология процессов брожения и гниения, патогенез возникновения инфекционных болезней и самозарождение организмов [15].

После того, как все описательные работы по морфологии и систематике были сделаны, пришло время переходить к изучению физиологии микроорганизмов. Труды Луи Пастера сподвигли микробиологию разделиться на три направления (общее, почвенное, медицинское) к концу XIX века.

Важным открытием для микробиологии стало введение в применение Робертом Кохом методов окраски бактерий, которые принял весь мир. Вслед за этим, в 1884 году, Ганс Христиан Грам создал еще один метод окрашивания, названный в его честь. Благодаря этим методам за следующие годы было описано большое количество видов, были выделены возбудители смертельных заболеваний, обнаружены новые процессы в цикле жизнедеятельности бактерий.

По мере появления все большего числа видов создавались специальные справочники, помогающие определять вид микроорганизмов. Одним из таких и используемым по сей день является справочник Дэвида Берджи.

Справочник Берджи по бактериологической систематике — основной источник определения видов бактерий. Он включает в себя все имеющиеся признаки, необходимые для верной классификации. Впервые был опубликован в 1923 году Дэвидом Берджи с целью систематизации структурных и функциональных особенностей бактерий [16].

Со временем происходило усложнение используемых приборов в идентификации бактерий, улучшение методик. С течением технологического прогресса стали появляться различные усовершенствованные микроскопы, позволяющие наблюдать за бактериями при разном увеличении и условиях. При развитии молекулярно-генетического периода развития микробиологии стали появляться и распространяться в использовании ПЦР реакции, секвенирование и т.д. В итоге, методики определения видов бактерий становились более точными и надежными, что позволяет в настоящее время практически безошибочно идентифицировать бактерии посредством различных приборов, затрачивая на это меньше времени и меньшее количество образца бактерий.

1.5 Классификация методов идентификации микроорганизмов

Из прошлой главы стало понятно, что микробиологи и бактериологи совершенствовали методы идентификации многие десятки лет, поэтому сегодня мы можем применять их в научной деятельности, использовать в медицине и даже в промышленном производстве.

Методы, о которых говорилось ранее, являются базовыми для многих методических материалов, которые помогают определить свойства бактерий:

- морфологические (свойства строения и особенности отдельных клеток);
- культуральные (сюда можно отнести: питание, дыхание, условия роста бактерий);
- ферментативные (свойства биохимии бактерий, которые связаны со способностью расщеплять белки и сахара, а также разрушать эритроциты);
- антигенные (свойства, которые связаны с особенностями антигенов бактерий)[17].

Получение чистых культур и точная идентификация микроорганизмов — проблема, актуальная для микробиологов всех времен. Перед идентификацией любых бактерий техника посева на питательные среды требует обязательного выделения чистой культуры. Это необходимо для того, чтобы из текущего эксперимента удалить представителей различных родов и видов и работать непосредственно с необходимыми организмами. Присутствие большого количества микробов при любом исследовании серьезно искажает будущие результаты [18].

В результате успешного развития молекулярной биологии удалось начать изучение генотипа микроорганизмов, что послужило началом создания геносистематики. Анализируя нуклеиновые кислоты, которые входят в изучение генотипа, можно построить филогению микроорганизмов [19].

Методы идентификации микроорганизмов делятся на рутинные и современные (подробнее о них в следующей главе). Рутинные методы основаны на выделении чистых культур. Это затрачивает множество компонентов реакций и питательных сред, а самое главное, это требует много времени [20].

Для идентификации дрожжевых культур применяется метод нумерической таксономии. Принцип метода: различные фенотипические признаки, которые поддаются учёту, считаются как равноценные, а это позволяет количественно выразить таксономические дистанции между микроорганизмами в виде отношения найденных признаков к общему числу имеющихся в базе данных признаков.

Вышеописанный метод можно применить только для оценки сходства между родами или видами. Такие ранги, как семейство и выше, будут недостоверно определены. Нумерическая таксономия позволяет отразить филогенетические свойства, но выводов, касаемых генетики, с её помощью не сделать.

Во время работы с современными методами идентификации микроорганизмов не требуется многочисленный персонал, не затрачивается большое количество времени, некоторые даже не требуют выделения чистых культур. Современные методы подразделяются на ручные и автоматические.

1.6 Современные методы идентификации бактерий

Как было сказано ранее, современные методы идентификации бактерий являются более быстрыми и не требуют большого количества высококвалифицированного персонала для проведения анализа.

К ручным современным методам идентификации микроорганизмов относят: систему индикаторных бумажек, наборы мультимикротестов, метод хроматографии.

Ручные тесты, применяемые для индикации и идентификации микроорганизмов, важны для медицинской микробиологии и широко

используются в санитарной микробиологии. Их постановка требует соблюдения стандартных условий проведения.

В последние десятилетия разработаны различные тест-системы: API-20E, Enterotube, Mycotube, Patho-Тес, СИБ, ПБДЭ и др. Система Enterotube представляет собой пластиковую камеру с 12 ячейками, содержащими окрашенные диагностические среды. Засев всех сред производится поступательно-вращательными движениями через камеру петли с посевным материалом. Инкубацию проводят в течение 24 ч при 37°C. О положительном или отрицательном результате теста судят по изменению цвета среды, разрыву агара (тест на газообразование) или после введения специальных реактивов (тест на образование индола, реакция Вогес—Проскауэра). Каждый признак обозначают определенной цифрой, поэтому полученные данные можно ввести в компьютер с соответствующей программой и получить ответ о таксономическом положении исследуемого штамма.

Система индикаторных бумажек (СИБ). Она представляет собой диски, пропитанные различными питательными средами. Эти специальные диски можно вносить в пробирки с бактериями или предварительно вкладывать в лунки планшетов, в которые вносят исследуемые культуры микроорганизмов. В частности, используют наборы дисков фирм Minitек (*Enterobacteriaceae*) и Minitек (*Neisseria*) для идентификации энтеробактерий и нейссерий. Способ позволяет получить результаты через 4 ч инкубации при 37°C.

Наборы мультимикротестов. Они представляют собой планшеты из пластика с лунками. В лунках располагаются питательные субстраты с индикаторами продуктов метаболизма бактерий. В лунки помещают суспензии изучаемых бактерий и термостатируют. Для идентификации гемофилов, энтеробактерий, листерий, стафилококков и др. используют тесты RapIDNH, которые позволяют получить ответ не позднее 4—8 ч.

Серологические методы идентификации бактерий. С их помощью, используя специфические антитела, выявляют бактериальные антигены. Чаще

всего в настоящее время пользуются методами ИФА-твердофазным и латекс-агглютинации [21].

Иммуномагнитное разделение. В основу метода положено использование активированных парамагнитных частиц размером порядка 2—3 мкм, которые покрываются антителами путем выдерживания при пониженной температуре до 24 ч. После инкубации несвязавшиеся антитела отмывают. После такой обработки частицы, покрытые антителами, добавляют к суспендированной пробе продукта питания, предположительно содержащей антигена, к которым специфичны антитела частиц (токсины или целые клетки в случае грамотрицательных бактерий). После добавления частиц пробу инкубируют при нормальной температуре от нескольких минут до нескольких часов, чтобы антитела связались с антигеном. Образованные комплексы собирают магнитом, после чего элюируют антиген и подсчитывают количество связавшихся частиц. Элюированный и сконцентрированный антиген может быть подвергнут другим методам анализа [22].

Хроматографические методы. С целью индикации и идентификации микроорганизмов нередко используют хроматографические методы. В объектах исследования определяют химический состав клеточной стенки и некоторые метаболиты микроорганизмов, причем как промежуточные, так и уникальные. Чаще всего у бактерий определяют короткоцепочечные жирные и тейхоевые кислоты, миколовую кислоту, используя метод газожидкостной хроматографии.

Нередко пользуются тонкослойной хроматографией. Содержание этих веществ у различных родов бактерий постоянное, и это явление позволяет идентифицировать виды [23].

Различия в составе липидов используют для идентификации бактерий на уровне рода и даже вида. Однако этот метод имеет определенные ограничения, поскольку содержание жирных кислот в клетках может зависеть от условий культивирования и возраста культуры.

В систематике некоторых бактерий учитывается состав хинонов и других переносчиков электронов, а также пигментов.

Важная информация о взаимном родстве бактерий может быть получена при изучении клеточных белков — продуктов трансляции генов. На основании изучения мембранных, рибосомных, суммарных клеточных белков, а также отдельных ферментов сформировалось новое направление — белковая таксономия. Спектры рибосомных белков относятся к числу наиболее стабильных и используются для идентификации бактерий на уровне семейства или порядка. Спектры мембранных белков могут отражать родовые, видовые и даже внутривидовые различия. Однако характеристики химических соединений клетки не могут использоваться для идентификации бактерий изолированно от других данных, описывающих фенотип, поскольку нет критерия оценки значимости фенотипических признаков.

Системы распознавания с использованием специальных приборов позволяют за сравнительно короткое время определить вид микроорганизма, а также его чувствительность/устойчивость к антимикробным препаратам.

Наибольшей популярностью пользуются автоматические системы идентификации микроорганизмов типа Microscan и Vitek.

Система Microscan. Данная система идентификации бактерий основана на явлениях турбидиметрии, колориметрии и флуоресценции. Система включает ряд пластиковых планшетов, в которые помещены биохимически активные субстраты. В основу распознавания грамотрицательных бактерий положено свойство комплекса антиген + антитело испускать «холодное» свечение благодаря искусственной адсорбции на антителах, светящихся в УФ-лучах, специальных белков — флуорохромов. Время анализа — 2 ч. Гемофилы, анаэробы и дрожжи идентифицируются методом, основанным на иммунохроматографии. Концентрацию антибиотиков определяют с учетом оптической плотности исследуемого субстрата. Система оборудована компьютером и программным обеспечением [24].

Система Vitek. Здесь используют планшеты. Суспензию бактерий определенной концентрации вносят в лунки. Распознавание микроорганизмов

основано на турбидометрии раствора в лунке. Время анализа — от 4—8 до 18 ч. Система оборудована компьютером и программным обеспечением [25].

Биосенсоры — оптоволоконные методы. Оптическим волокном называют волновод, выполненный из стекла или полимеров и проводящий свет за счет полного внутреннего отражения. В оптоволоконном биосенсоре для улавливания биологической реакции и преобразования ее в различимый оптический сигнал используют оптический или электронный преобразователь.

Оптоволоконный биосенсор представляет собой клиновидный оптоволоконный зонд, покрытый изнутри специфическими антителами. Свет полупроводникового лазера проходит через всю систему оптических волокон и выходит на ее конце в виде исчезающей волны. Когда с антителами на конце связывается флуоресцентно меченый антиген, исчезающая волна взаимодействует с ним, испуская флуоресцентный сигнал во всех направлениях, в том числе и внутрь световода — к сенсорной системе. В качестве флуоресцентной метки используют флуоресцентные красители, такие как Су5.

В оптоволоконной системе поверхностного плазмонного резонанса антитела закреплены на поверхности тонкой металлической пленки, расположенной на отражающей поверхности оптически прозрачного стеклянного световода. Когда сквозь волновод проходит видимый или инфракрасный свет, он отражается от металлической пленки. Взаимодействие отраженного света с электронами на поверхности металла и резонансный эффект вызывают сильное поглощение, причем оно тем сильнее, чем выше концентрация комплексов антиген—антитело на поверхности металлической пленки. Чем больше комплексов образовалось, тем длиннее поглощаемые волны [26].

1.7 Метод масс-спектрометрии

MALDI-TOF является надежной диагностической методикой идентификации микроорганизмов и основывается на том, что в процессе исследования обнаруживается масс-спектр белков рРНК бактерии. Такие белки

обладают сильной устойчивостью к мутациям и являются высокоспецифичными [27].

Для исследования MALDI-TOF применяют бактериальные культуры, растущие на специальной микробиологической среде. В исключительных случаях допускается определение видовой принадлежности в биологических материалах или в жидких пробах.

Белки α -гемолитических стрептококков отличаются высоким сходством, поэтому масс-спектрометрия не является надежным методом их определения, что является недостатком данной методики.

Главным преимуществом масс-спектрометрии является высокая скорость анализа. Это чрезвычайно важно при лечении заболеваний, имеющих бактериальную природу. Кроме того, данный метод обладает высокой надежностью. Информация, получаемая с помощью MALDI-TOF методики коррелирует с данными, которые предоставляют классические методы определения видовой принадлежности бактерий [28].

Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов может быть осуществлена двумя способами: по спектру белков микробов – белковое профилирование (MALDI-TOFMS) и по клеточным липидам – метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ/МС).

Внедрение в клиническую микробиологию технологий, основанных на масс-спектрометрии MALDI-TOFMS (Нобелевская премия, 2002 г., Танака Коити) открыло новые возможности очень точной идентификации возбудителей инфекционных заболеваний. MS наиболее эффективна при анализе нуклеиновых кислот (ДНК/РНК), белков и пептидов бактерий. MALDI-TOFMS идентификация микроорганизмов основана на определении уникального для каждого вида микроорганизмов набора белков – своеобразный «отпечаток пальца» (фингерпринтинг) микроорганизма, «протеомная дактилоскопия» [29].

Идентификация осуществляется в основном по рибосомальным белкам, которые присутствуют во всех микроорганизмах. Сущность метода заключается в превращении (с помощью лазерных импульсов) органического вещества микроорганизмов в заряженные частицы - ионы. Этот процесс называется ионизацией. При этом молекулы вспомогательного вещества – матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота), и изучаемого микроорганизма (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Ионы, полученные в результате ионизации с помощью электрического поля, переносят в газовую фазу вакуумной части масс-спектрометра. В глубоком вакууме анализатора под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Так происходит сортировка заряженных ионов по массам (точнее, по отношению массы к заряду, или m/z) по времени пролета ими определенного расстояния. После попадания ионов на детектор и оцифровки результата программа масс-анализатора оценивает время пролета частиц, строится масс-спектр – график, по оси абсцисс которого находится соотношение m/z , а по оси ординат – количество ионов, зарегистрированных детектором в конкретный момент времени. Полученный масс-спектр сопоставляется со спектрами из базы данных масс-анализатора, и на основании сведений о массах характеристических белков осуществляется идентификация микроорганизмов.

Для проведения MALDI-TOFMS идентификации возбудителей требуется масс-спектрометр, соответствующая программа и база данных. Методика проведения идентификации проста и состоит из двух этапов: подготовки исследуемой чистой культуры микроорганизма и собственно идентификации [30].

Сегодня трудно представить область человеческой деятельности, где не нашла бы применения масс-спектрометрия. Масс-спектрометрия получает все более широкое использование в медицине: разработка новых лекарственных

средств, контроль их производства, генная инженерия и биохимия, протеомика. В клинических лабораториях метод находит применение для масс-спектрометрического выявления большинства стероидных гормонов (включая экзогенного происхождения) и определения уровня аминокислот и ацилкарнитинов [31]. Масс-спектрометрия позволяет идентифицировать белки, определять их структурные изменения вследствие различных взаимодействий при их воспроизводстве, определять пути метаболизма лекарственных средств. Без масс-спектрометрии невозможен контроль над незаконным распространением наркотических и психотропных средств, криминалистический и клинический анализ токсичных препаратов, анализ взрывчатых веществ. Находит масс-спектрометрия применение и в микробиологии.

1.8 Генетические методы

Наибольшее распространение среди методов генетики приобрел анализ последовательности нуклеотидов. Давно стало известно, что молекулы ДНК имеют организацию в виде длинных цепей, а точнее, полимеров, в которых гены чередуются с некодирующими участками. Эти некодирующие участки иногда могут нести функционал, который заключается в выполнении регуляторной функции [32].

С помощью методов биоинформатики можно моделировать продукты гена, его свойства, сравнивать микроорганизмы между собой, но только зная последовательность нуклеотидов в этом гене.

Среди главных методов идентификации выделяют:

- методы, которые основаны на рестрикционном анализе;
- методы, основанные на изучении повторяющихся последовательностей геноме;
- секвенирование генома или отдельных генов, в том числе NextGenerationSequencing;
- полимеразная цепная реакция (ПЦР) [33].

На данном этапе развития науки часто стали применять сочетание нескольких методов: культивирование микроорганизмов и визуальное наблюдение за ними с помощью методов молекулярной биологии и генетики, которые позволяют идентифицировать не только виды, но и штаммы микроорганизмов. Это связано с разными сложностями при идентификации до вида.

Полимеразная цепная реакция – это один из самых востребованных методов в лабораториях, занимающихся биологией и медициной. Сейчас без метода ПЦР сложно представить молекулярную биологию, генетику, а в особенности клиническую диагностику. Метод ПЦР основан на амплификации ДНК, то есть, позволяет в разы увеличить количество необходимых фрагментов ДНК в каком-либо биологическом материале [34].

Метод ПЦР может использоваться в биологических и медицинских лабораториях для установления родства, при клонировании генов, для диагностики наследственных или инфекционных заболеваний. У данного метода широкий спектр выполняемых задач.

Как было сказано ранее, метод основан на многократном копировании необходимых для работы участков молекулы ДНК. Из-за сложностей в детекции единичных молекул ДНК, в системе *in vitro* применяются специальные ферменты. Если необходимый нам фрагмент гена присутствует в реакции, амплификация проходит успешно.

Метод полимеразной цепной реакции удобен при идентификации только в том случае, если генетический код исследуемых микроорганизмов хорошо изучен и известны праймеры, несмотря на перечисленные выше преимущества. Для сравнения, секвенирование может расшифровать абсолютно новые, ранее не известные последовательности [35].

Секвенирование по Сенгеру является самым распространенным видом секвенирования. За последние двадцать лет данный метод претерпел множество изменений, касающихся способа детекции и не только. Однако метод Сенгера

уступает методу ПЦР из-за того, что количество прочтений с одного запуска ограничено, а стоимость прибора очень велика.

Не так давно были также разработаны новые подходы, которые открыли возможности геномного, транскриптомного и метагеномного анализа [36].

Метагеномный анализ позволяет дать характеристику различным микроорганизмам в пробе. На сегодняшний день это основной приём. Анализ стал возможен благодаря появлению NGS секвенирования. Биоразнообразие пробы характеризуют с помощью двух этапов: мишень-направленного секвенирования нужных маркерных участков и полноценного секвенирования метагенома.

Первый способ объективно проще технически, так как требует меньше затрат финансовых и времени на подготовку проб, а после обработку данных. Однако, есть одна поправка: первый способ позволяет провести только оценку разнообразия, а второй способ способен получить практически полную информацию о составе и генетических свойствах определенного сообщества. В качестве маркеров обычно используются участки генов 16S рРНК у прокариот, 18S рРНК у эукариот и ITS-участки у грибов.

Существует также секвенирование нового поколения. Главное отличие данного метода – высокая производительность метода. Метод может многократно «прочитать» каждую из молекул ДНК, а это существенно повышает точность идентификации микроорганизмов или изменений в их геноме. Если ДНК была выделена из образцов чистых культур, метод позволяет за один запуск прибора «прочитать» несколько геномов бактерий или определить полный видовой состав того или иного места [37].

Также в качестве одного из наиболее распространенных методов можно привести метод ddPCR – цифровая полимеразная цепная реакция. Данный метод был усовершенствован и стал применяться при количественном определении и клонировании амплификации нуклеиновых кислот, включая ДНК и РНК. Стоит отметить, что различие между цифровой и традиционной ПЦР заключается в способе измерения НК. Цифровой метод является более

точным, но остается подвержен ошибкам, если допустить к работе с прибором неопытного специалиста. ddPCR выполняет лишь одну реакцию в пробе, но при этом образец разделяют на большое количество частей, и реакция проводится в каждой части индивидуально. Благодаря этому разделению можно получить более достоверный результат и большую чувствительность измерения количества НК [38].

1.9 Метод ARDRA

В основе метода лежит молекулярно-генетическая оценка размеров фрагментов гипервариабельной области гена 16S рРНК бактерий. Ген 16S рРНК — это ген-маркер, который является наиболее распространенным у бактерий. Его таксоноспецифичные участки используются для определения видовой принадлежности микроорганизмов, в т. ч. труднокультивируемых. Данный анализ можно проводить с использованием дорогостоящего высокопроизводительного секвенирования нового поколения или методом анализа размеров терминальных участков рестрикционных фрагментов (Т-ПДФ), основанного на комбинировании ПЦР-амплификации и эндонуклеазной рестрикции с применением меченых олигонуклеотидных праймеров [39].

Эндонуклеазы рестрикции, или рестриктазы — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз. Данный класс катализирует гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродной ДНК в большинстве прокариотических организмов (бактерии и сине-зеленые водоросли) и в некоторых других организмах, выполняя тем самым "иммунную" функцию. Рестриктазы — это ферменты, которые «узнают» определенные последовательности, а именно сайты рестрикции в двухцепочечной ДНК.

Если экзонуклеазы по своей природе расщепляют нуклеиновые кислоты с конца молекулы, то рестриктазы делают это в середине. При этом каждая из рестриктаз может узнать определенный участок ДНК длиной от четырех пар нуклеотидов.

Перечисленные выше ферменты эффективно применяются в исследованиях. Благодаря их работе можно превращать большие молекулы ДНК в набор фрагментов, длина которых может варьироваться от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. Метод электрофореза в агарозном геле на следующем этапе сможет легко разделить фрагменты ДНК, отличные по размеру, а затем изучить каждый из фрагментов отдельно [40].

Ген 16S рРНК состоит из полутора тысяч п. о., около девятисот из них имеют устойчивость к мутациям, ввиду чего данный ген является инструментом филогенетической систематики. Это дает возможность сравнивать нуклеотидные последовательности данного гена, принадлежащие различным бактериям, между собой.

Метод ARDRA в дополнение к классическим методам может служить достаточно удобным способом идентификации микроорганизмов. На данный метод не так сильно влияет загрязнение ДНК, как на секвенирование. Используя метод ARDRA, результат можно получить в течение дня.

Сопутствующие исследования показали, что исследования по методу ARDRA дают более подлинны результаты по сравнению с масс-спектрометрическим анализом видовой принадлежности бактерий [41].

2 Материалы и методы

2.1 Объекты

Смешанные образцы бактерий, использованные для выделения ДНК, были получены от Демьянчук Дарьи, магистранта кафедры биотехнологии, высеяны мной на кафедре биотехнологии. Из них были выделены чистые культуры.

2.2 Методика анализа *in silico*

In silico – термин, обозначающий компьютерное моделирование эксперимента, чаще биологического. С помощью компьютерного моделирования, используя специальное программное обеспечение, анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, производят выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт. Осуществляют такие методы как: теоретические амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Данный метод позволяет анализировать различные геномы, имеющие длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов, за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними.

Был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов их генов 16S-рРНК с помощью программы pDRAW32. После теоретического рестриктирования ампликонов последовательностей 8F-1492R, взятых из базы данных GenBank, для каждого вида были построены рестрикционные профили.

2.2 Метод получения чистой культуры

Метод Дригальского основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри. Каждая

микробная клетка, фиксируясь в определенном месте, начинает размножаться, образуя колонию.

Методика заключается в следующем: берем 5 чашек Петри с питательной средой. На первую чашку петлей или пипеткой наносим каплю исследуемого материала и растираем шпателем по всей поверхности питательного агара. Затем шпатель переносим во вторую чашку и втираем оставшуюся на шпателе культуру в поверхность питательной среды. Далее шпатель переносим в третью чашку, после в четвертую и пятую, и аналогичным образом производим посев. На первой чашке вырастает максимальное количество колоний, на пятой — минимальное. В зависимости от содержания микробных клеток в исследуемом материале на одной из чашек вырастают отдельные колонии, пригодные для выделения чистой культуры микроорганизма.

2.3 Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду

Посев на питательную среду, в нашем случае скошенный агар в пробирках, проводим следующим образом: в правую руку берем микробиологическую петлю и стерилизуем ее нагреванием в пламени спиртовки. Пробирку с культурой берем в левую руку так, чтобы хорошо видеть поверхность питательной среды с выросшими колониями бактерий. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимаем наружный конец ватной пробки к ладони и вынимаем пробку из пробирки. Край открытой пробирки слегка обжигаем в пламени спиртовки и вводим в пробирку стерильную петлю. Петлю охлаждаем прикосновением к внутренней поверхности стекла пробирки или на свободной от микроорганизмов части среды и после этого захватываем некоторое количество микробной биомассы. С осторожностью вынимаем петлю из пробирки, горлышко пробирки вновь обжигаем, ватную пробку несколько раз быстрыми движениями проводим над пламенем спиртовки и закрываем ею пробирку. Пробирку с культурой помещаем обратно в штатив, а петлю вводим в пробирку со скошенной агаризованной средой почти до дна. Слегка прикасаясь петлей к

поверхности среды, проводим от дна вверх зигзагообразную или прямую черту-штрих.

Оставшиеся на петле после пересева клетки микроорганизмов тщательно сжигаем в пламени спиртовки. В этом случае прокаливание петли лучше начинать с участка проволоки, ближе к основанию держателя, чтобы клетки, оставшиеся на петле, подсохли и не образовали аэрозоль, загрязняющий воздух. Затем петлю переводим в вертикальное положение, прокаливаем докрасна и только после этого ставим на место.

2.4 Методика выделения ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК проводилось с использованием набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit производства компании Axugen (производства КНР).

Максимальный выход бактериальной ДНК достигается с помощью суспендирования биомассы бактерий в специальном лизисном буфере G-A (идет в наборе).

С помощью фазоразделительного шага (добавление смеси состоящей из изопропанола и изобутанола) происходит отделение геномной ДНК от ненужных веществ, например: протеины, полисахариды и липиды. Очищенная геномная ДНК находится в нижней фазе, верхняя фаза - органика; средняя - разрушенные клетки и денатурированные белки.

Раствор ДНК пропускают через фильтр, на котором оседают белки, липиды, полисахариды, и клеточные стенки бактерий.

Затем ДНК наносится на специальную колонку, где происходит связывание ДНК с силикатной мембраной. Необходимый шаг – центрифугирование: один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2, содержащего этиловый спирт. Центрифугирование идет 2 минуты при 12000 оборотах. Центрифугирование помогает избавиться от нежелательных молекул, случайно попавших в раствор.

Очищенную бактериальную ДНК смывали с колонки элюентом или

дистиллированной водой.

2.5 Методика проведения полимеразной цепной реакции

Реакция ПЦР проводилась в приборе ThermalCycler C1000.

На одну пробу объемом 50мкл требуется:

- 27 мкл дист. воды
- 5 мкл 10x буфера
- 5 мкл + 5 мкл праймеров с концентрациями по 1μM (8F и 1492L)
- 3 мкл MgCl₂ с концентрацией 2.5mM

Все вещества смешивали в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 15 проб, затем в каждую было добавлено по 47 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК. После горячего старта в каждую из пробирок добавили по 1 мкл ДНК Tag - полимеразы.

Для визуализации результатов амплификации использовали электрофорез. После окончания электрофореза гель помещали в транслюминатор гель-документирующей системы. Проведенный электрофорез ампликонов ДНК показал, что реакция ПЦР прошла успешно, и мы смогли выделить участки ДНК гена 16S рРНК длиной 1500 пар оснований.

Используемая программа при проведении ПЦР:

1. 94⁰C – 3:00 мин.
2. 95⁰C – 0:10 сек.
3. 62⁰C – 0:20 сек.
4. 72⁰C – 1 мин 40 сек. (1:00 мин. для ампликонов 1350 R - 500 L).
5. Goto 3:35 times.
6. 72⁰C for 10:00 мин.
7. 4⁰C – forever.

2.6 Методика проведения электрофореза

Необходимое оборудование для проведения электрофореза

1. Источник питания Bio-RadPowerPacHV (1-400 Вт, 0,01-500 мА, 20-5000 В).

2. Камера для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-SubCellGT, Bio-Rad.
3. Гель-документирующая система Bio-RadGelDocXRс компьютером.

Ход работы:

1. Добавили необходимое количество порошка агарозы (0,75 г) в рассчитанный объем электрофорезного буфера (50 мл).
2. Нагревали взвесь в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не образовала равномерную суспензию. Суспензию довели до начала кипения, затем осторожно удалили из микроволновой печи и охладили до 70⁰ С.
3. Залили полученную суспензию в форму для агарозы.
4. Установили гребенку в форму для агарозы. Необходимо, чтобы между дном лунки от гребенки и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 0,5-1,0 мм.
5. После того как гель полностью затвердел (через 20-30 мин.), удалили гребенку и поместили гель в электрофорезную кювету.
6. Добавили достаточное количество электрофорезного буфера.
7. Смешали пробы ДНК с буфером для нанесения, содержащим глицерин и красители (бромфеноловый) в соотношении 5:1.
8. С помощью автоматической микропипетки внесли смесь в лунки геля под электрофорезный буфер.
9. Подсоединили электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении разделения в агарозных гелях составляет 50 V. Красители, как и ДНК, перемещаются к аноду. Бромфеноловый синий передвигается со скоростью равной скорости фрагмента ДНК из 900 пар оснований.
10. По окончании разделения вынули подложку с гелем из кюветы и поместили гель в красящий раствор (1 мкг/мл этидиум бромид). После 20 мин. прокрашивания вынули гель и промыли в воде в течение 2 мин.
11. Удалили лишнюю жидкость и переложили гель в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы.

12. Рассмотрели гель в проходящем ультрафиолетовом свете. Зафиксировали полученное изображение и оформили результаты, используя гель-документирующую систему.

2.7 Проведение реакции рестрикции

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixercomfort производства фирмы Eppendorf. Реакция проходила при 37 °С для рестриктазы *Msp I* в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

Постановка реакции рестрикции. Для 1 пробы объемом 50 мкл необходимо:

- 5 мкл 10х буфера
- 10 мкл разб. BSA
- 25 мкл H₂O
- 10 мкл ДНК
- 5 мкл фермента (активность фермента 10 000 е.а/мл)

Все вещества смешали на холоде в 1 пробирке объемом 2 мл, из расчета на 7 проб, затем в каждую пробирку добавили по 35 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК.

Для визуализации результатов рестрикции использовали электрофорез. Все использованные нами рестриктазы имеют тетрануклеотидный сайт узнавания, что позволило получить от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продуктов амплификации, имеющих длины порядка 900 пар нуклеотидов.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Результаты получения чистых культур бактерий

Получение чистых культур из смешанных образцов проводилось следующим образом: брали смешанные культуры бактерий, подхватывали часть бактерий микробиологической петлей и переносили в пробирку с водой, помешивая при этом, чтобы превратить субстанцию в однородную. После капали бактериологической петлей одну каплю из пробирки в первую чашку Петри с питательной средой, шпателем растирали по всей поверхности, перенося и растирая по очереди во всех пяти чашках. После того, как бактерии выросли, пересевали из пятой чашки Петри, где образовались изолированные колонии, на скошенный агар в разные пробирки. Через 3 дня получали чистые культуры в пробирках на скошенном агаре, с которыми можно было проводить дальнейшие исследования.

3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий

Выделение ДНК проводили с использованием набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit.

С помощью фазоразделительного шага (добавление смеси состоящей из изопропанола и изобутанола) провели отделение геномной ДНК от ненужных веществ. Очищенная геномная ДНК находилась в нижней фазе, верхняя фаза представляла собой органику; средняя - разрушенные клетки и денатурированные белки.

Раствор ДНК пропускали через фильтр, на котором оседали остатки белков, липидов, полисахаридов, и клеточных стенок бактерий.

Затем ДНК наносили на специальную колонку, где происходило связывание ДНК с силикатной мембраной. Необходимый шаг – центрифугирование: один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2, содержащего этиловый спирт. Центрифугирование шло 2 минуты при 12000 оборотах. Центрифугирование

помогло избавиться от нежелательных крупных частиц. Промытую бактериальную ДНК элюировали с колонки специальным элюентом или бидистиллированной водой.

ДНК, выделенная из образцов биомассы грамположительных бактерий, была проанализирована спектрофотометрическим и электрофорезным методами. Ниже представлена таблица значений концентраций и качества полученных препаратов.

В ходе данной работы была выделена ДНК 12 образцов бактерий.

Таблица 1 – Концентрации и коэффициент качества полученных препаратов ДНК.

Номер пробы	Концентрация ДНК(мкг/мл)	Чистота препарата (E ₂₆₀ /E ₂₈₀)
1	57,2	1,86
2	41,4	1,90
3	58,7	1,84
4	34,1	1,89
5	30,3	1,98
6	61	1,85
7	49,3	1,92
8	46,8	1,83
9	39,1	1,85
10	36	1,91
11	52,6	1,89
12	45,6	1,89

Из таблицы 1 мы видим, что концентрация ДНК при стандартной методике выделения у разных видов может отличаться в связи с особенностями этих видов. Так, например, клеточная стенка бактерий рода *Bacillus*

разрушается хуже, в сравнении с другими бактериями, что мы можем увидеть, как раз, по меньшей концентрации ДНК среди проб выделенной ДНК предположительно рода *Bacillus*. Качество полученных препаратов ДНК было очень хорошим, так как отношение E_{260}/E_{280} для них было в пределах 1,8 – 2,0.

Качество и средние размеры молекул ДНК были проанализированы также методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле. Ниже представлена электрофореграмма для суммарной ДНК первых шести образцов бактерий.

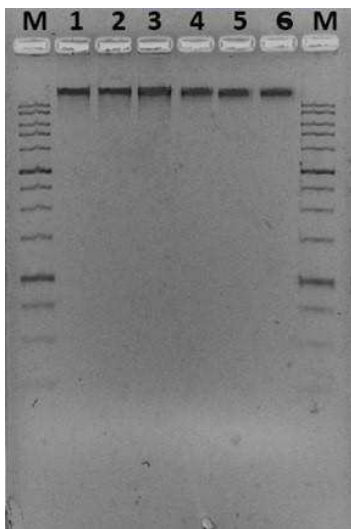


Рисунок 1 – Электрофореграмма геномной ДНК первых шести образцов бактерий

М - ДНК маркер 1 kb

1-6 - ДНК исследуемых образцов бактерий

На рисунке 1 представлен результат электрофореза выделенной ДНК первых шести исследуемых образцов бактерий. Полоски четкие, сопутствующего обычно светящегося шлейфа (шмира) практически нет. Масса выделенной суммарной ДНК составила более 10 000 п.о., что свидетельствует об успешности выделения ДНК. Электрофореграммы остальных шести образцов показали сходные картины.

По результатам анализа полученных препаратов ДНК (таблица 1, рисунок 1) все образцы обладали хорошим качеством и могли быть использованы для дальнейших исследований.

С использованием образцов выделенной ДНК была проведена ПЦР для получения ампликонов, которые соответствуют выбранному участку гена 16S рРНК. Результаты ПЦР были проанализированы.

3.2 Получение ампликонов гена 16S рРНК

После проведения ПЦР с использованием выделенных образцов ДНК были получены ампликоны, которые соответствуют выбранным участкам гена 16S рРНК. Это участки, ограниченные последовательностями, комплементарными праймерам 8F- и 1492R. Электрофореграмма полученных ампликонов приведена ниже.

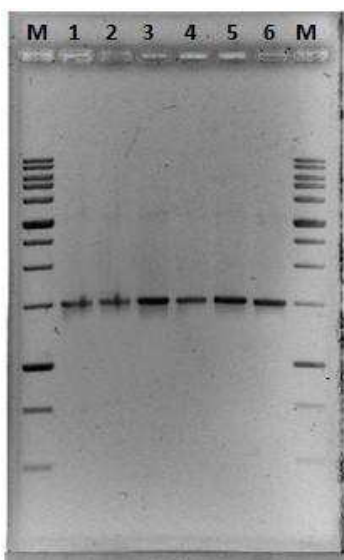


Рисунок 2 – Ампликоны гена 16S-рРНК первых шести образцов бактерий, ограниченные последовательностями, комплементарными праймерам 8F- и 1492R.

М – ДНК маркер 1kb (Сибэнзим)

1 – 6 Исследуемые образцы бактерий

На рисунке 2 представлен результат электрофореза ампликонов гена 16S рРНК первых шести исследуемых образцов бактерий. Масса ампликонов 8F – 1492R составила около 1500 п.о., что свидетельствует об успешном проведении ПЦР. Электрофореграммы остальных шести образцов показывали сходные картины.

Полученные ампликоны были подвержены гидролизу с использованием эндонуклеаз Msp I и Nha I. Результаты гидролиза представлены ниже.

3.3 Результаты реакций рестрикции

Экспериментальные результаты рестрикции ампликонов 8F – 1492R с использованием рестриктазы Msp I.

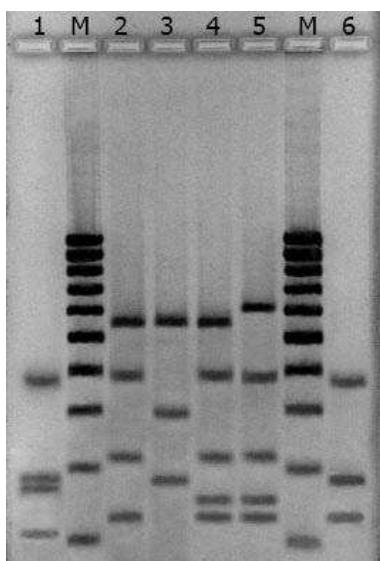


Рисунок 3 – Электрофореграмма ампликонов 8F – 1492R образцов исследуемых бактерий после обработки рестриктазой Msp I.

Полученные препараты ДНК бактерий были достаточно хорошего качества, чтобы получить ампликоны 8F - 1492R и провести их анализ с использованием рестриктазы Msp I.

Экспериментальные результаты рестрикции ампликонов 8F – 1492R с использованием рестриктазы Hha I.



Рисунок 4 – Электрофореграмма ампликонов 8F – 1492R образцов исследуемых бактерий после обработки рестриктазой Hha I.

3.4 Результаты анализа *in silico*

В ходе работы были виртуально получены и прорестриктированы ампликоны 8F – 1492R гена 16SpPHK различных видов бактерий, взятых из базы данных GenBank с использованием 2-х рестриктаз Msp I и Hha I.

Ниже представлены таблицы для тех видов, которые были идентифицированы с помощью метода масс-спектрометрии.

Таблица 2 – Размеры рестриктов ампликонов 8F – 1492R полученные после проведения теоретического рестриктирования рестриктазой Msp I. Данные для, *Arthrobacter aureescens*, *Bacillus pumilus*, *Flavobacterium hydatis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter globiformes*.

Рестрикта за	<i>Arthrobacter aureescens</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Flavobacterium hydatis</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Arthrobacter globiformes</i>
Msp I	378, 176, 161, 160, 117, 93	538, 389, 211, 129, 81, 64	451, 446, 235, 118, 86, 78, 47, 15	538, 390, 211, 145, 128, 59, 11, 9	606, 390, 211, 147, 128, 12	383, 169, 130

Таблица 3 – Размеры рестриктов ампликонов 8F – 1492R, полученные после проведения теоретического рестриктирования рестриктазой Hha I. Данные для *Micrococcus luteus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter globiformis*.

Рестрикта за	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i>
Hha I	669, 406, 253, 157	608, 389, 163, 153, 128, 48, 12, 11	579, 402, 346, 182, 22	868, 403, 240	403, 357, 279, 250, 207	471, 382, 254, 157, 156, 42

По результатам рестрикционного анализа были построены теоретические электрофореграммы, которые мы сравнили с практическими и использовали для идентификации бактерий.

Ниже представлены теоретические электрофореграммы бактерий из таблиц 2, 3 для рестриктаз Msp I и Hha I соответственно:

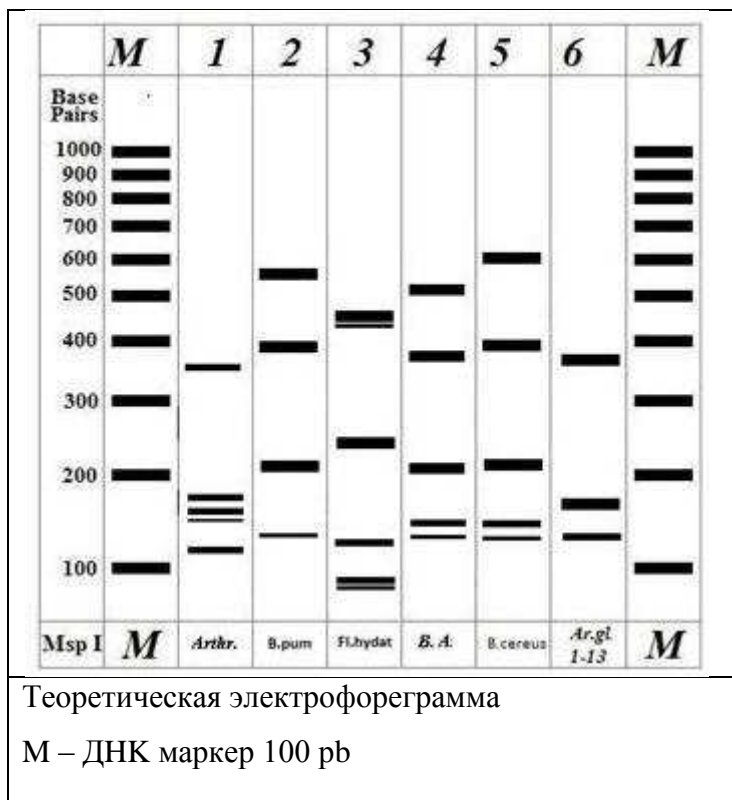


Рисунок 5 – Теоретическая электрофореграмма бактерий для рестриктазы MspI.



Рисунок 6 – Теоретическая электрофореграмма бактерий для рестриктазы HhaI.

3.5 Сравнение теоретических и практических электрофореграмм

Полученные в программе pDRAW32 теоретические электрофореграммы сравнивались с полученными практическими на наличие совпадений профилей рестриктов. Для рестриктирования ампликонов 8F-1492R были взяты рестриктазы Msp I и Hha I.

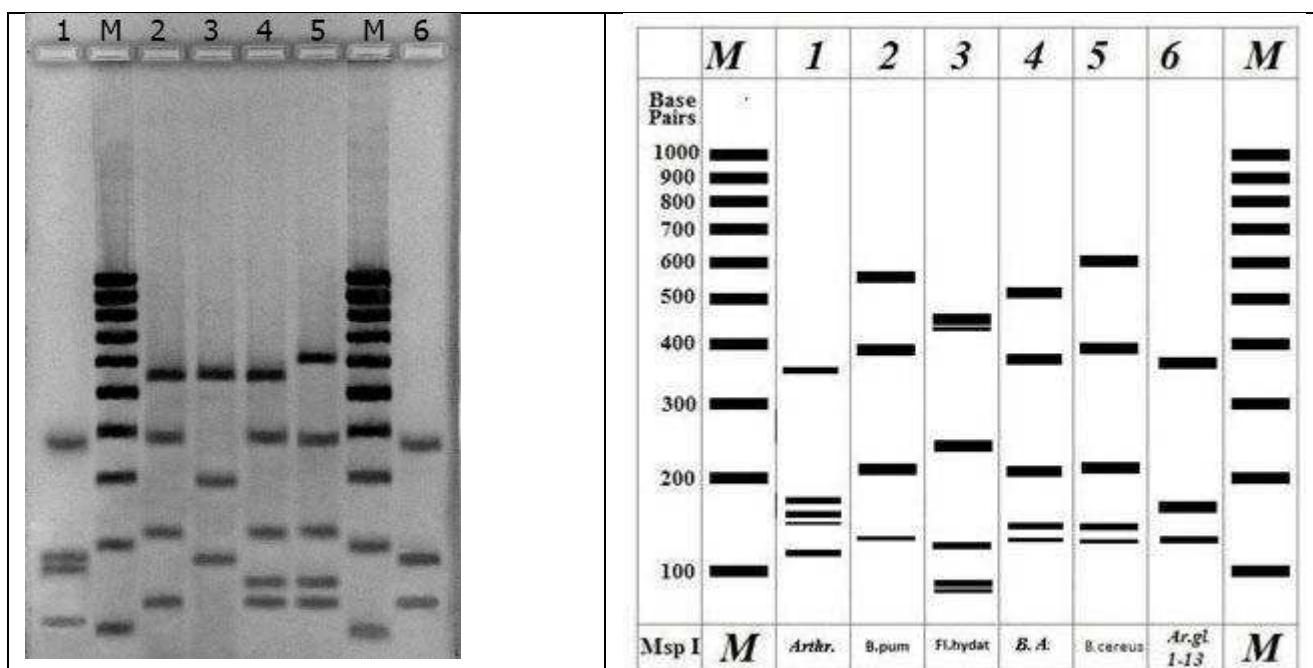


Рисунок 7 – Экспериментальная и теоретическая электрофореграммы предполагаемых образцов *Arthrobacter aureescens*, *Bacillus pumilus*, *Flavobacterium hydatis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter globiformes* (слева направо) после обработки рестриктазой Msp I.

На рисунке 7 представлены электрофореграммы для первых шести образцов исследуемых бактерий после обработки рестриктазой Msp I. Как можно заметить, образец 1 соответствует *Arthrobacter aureescens*, образец 2 - *Bacillus pumilus*, образец 4 - *Bacillus atrophaeus*, образец 5 - *Bacillus cereus*, образец 6 - *Arthrobacter globiformis*, а образец 3 не соответствует рестриктному профилю определённой методом MALDI-TOF *Flavobacterium hydatis*.

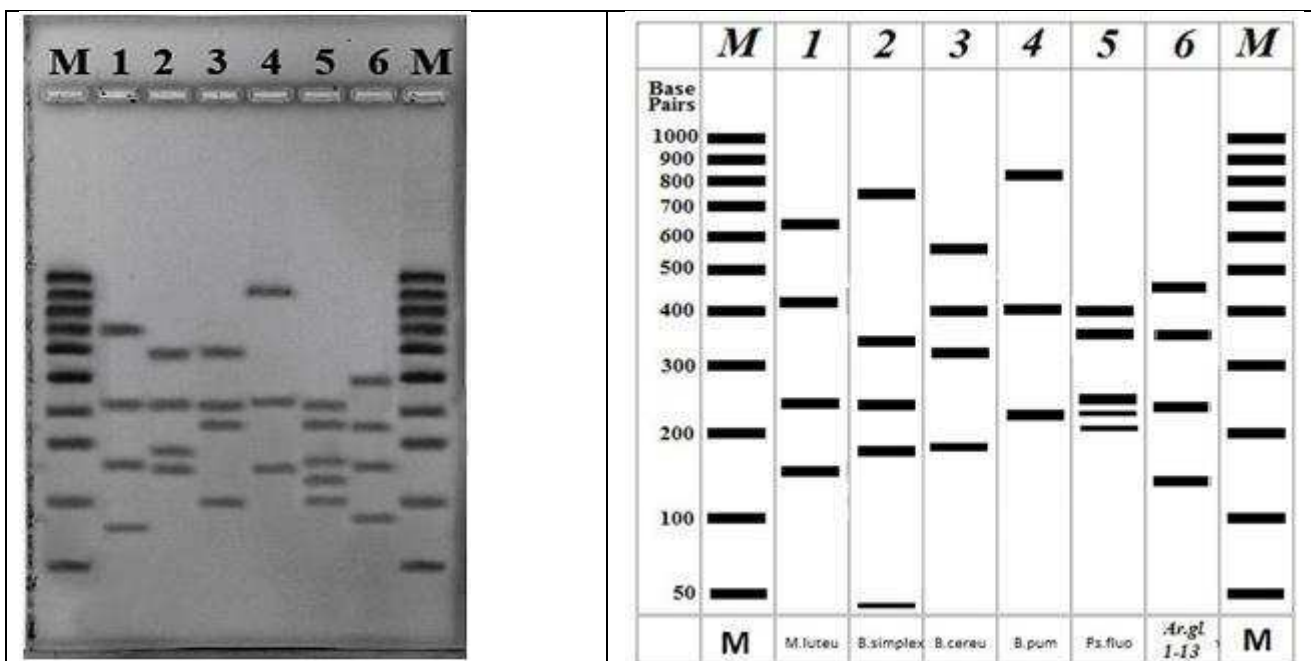


Рисунок 8 – Экспериментальная и теоретическая электрофореграммы предполагаемых образцов *Micrococcus luteus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter globiformis* (слева направо) после обработки рестриктазой Nha I.

На рисунке 8 представлены электрофореграммы для вторых шести образцов исследуемых бактерий после обработки рестриктазой Nha I. Как можно заметить, образец 1 соответствует *Micrococcus luteus*, образец 3 соответствует *Bacillus cereus*, образец 4 – *Bacillus pumilus*, образец 5 – *Pseudomonas fluorescens*, образец 6 - *Arthrobacter globiformis*, а образец 2 не соответствует рестриктному профилю определённой методом MALDI-TOF *Bacillus simplex*.

Благодаря накопленной нами базе данных, удалось подобрать теоретические рестриктные профили для бактерий, которые не показали совпадения на предыдущих рисунках.

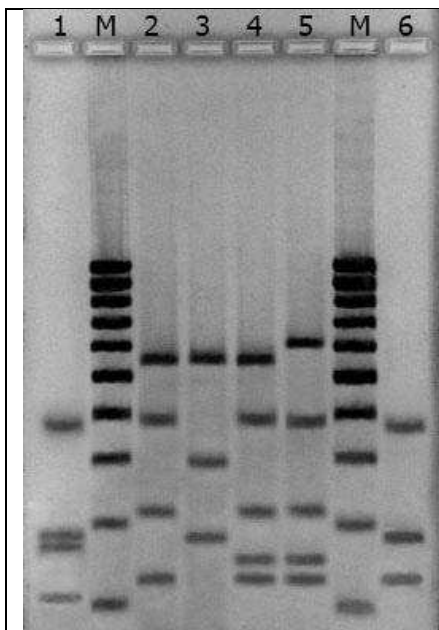


Рисунок 9 - Электрофоретическое разделение после обработки рестриктазой MspI.
 М – Маркер 100+50 бр
 1 – Образец 1
 2 – Образец 2
 3 – Образец 3
 4 – Образец 4
 5 – Образец 5
 6 – Образец 6

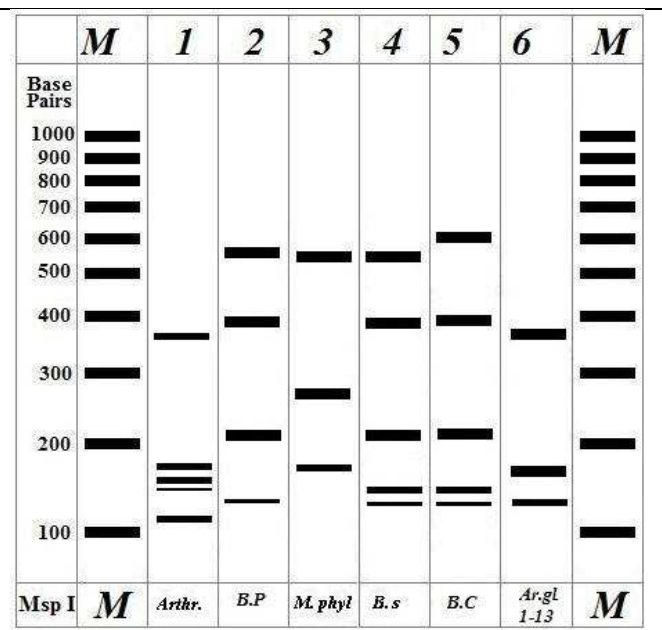
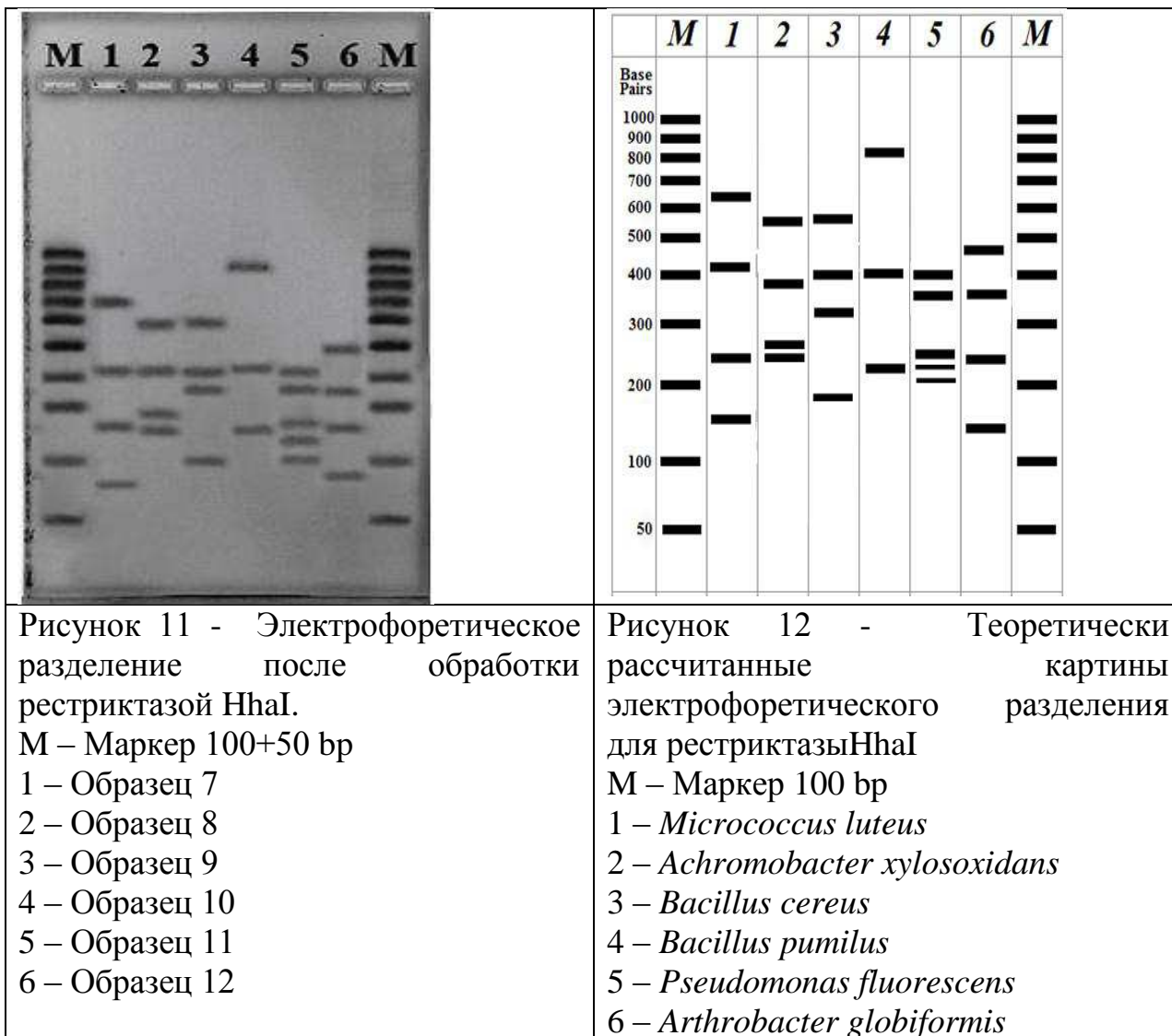


Рисунок 10 - Теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения для рестриктазы MspI.
 М – Маркер 100 бр
 1 – *Arthrobacter aureescens*
 2 – *Bacillus pumilus*
 3 – *Microbacterium phyllosphaerae*
 4 – *Bacillus atrophaeus*
 5 – *Bacillus cereus*
 6 – *Arthrobacter globiformis*

Из сравнения рисунков 9 и 10 мы видим, что рестриктные профили образцов, которые были обработаны рестриктазой Msp I, на теоретической и практической электрофореграммах показывают совпадение во всех случаях.



Из сравнения рисунков 11 и 12 мы видим, что рестриктные профили образцов, которые были обработаны рестриктазой Hha I, на теоретической и практической электрофореграммах показывают совпадение во всех случаях.

Таблица 4 – Сравнение видов бактерий, идентифицированных с помощью метода масс-спектрометрии и метода ARDRA.

Номер пробы	Название бактерий, идентифицированных методом масс-спектрометрии	Название бактерий, идентифицированных методом ARDRA
1	<i>Arthrobacter aurescens</i>	<i>Arthrobacter aurescens</i>
2	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
3	<i>Flavobacterium hydatis</i>	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
4	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i>
5	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
6	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i>
7	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
8	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Achromobacter xyloxidans</i>
9	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
10	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
12	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i>

С помощью метода ARDRA удалось идентифицировать образцы бактерий и сравнить свои данные с данными, полученными методом масс-спектрометрии. Как можно увидеть из таблицы 4, анализ показал совпадение в определении десяти видов бактерий. В двух случаях удалось уточнить данные, полученные методом масс-спектрометрии.

Заключение

В ходе работы были получены чистые культуры двенадцати образцов бактерий. Из них была выделена и очищена ДНК. Используя пары праймеров 8F и 1492R были получены ампликоны гена 16S рРНК, соответствующие длине около 1500 п.о. С полученными ампликонами были проведены реакции рестрикции. Сравнение полученных нами экспериментальных электрофореграмм с теоретическими из нашей базы данных выявило, что исследованные образцы бактерий являются представителями следующих видов: *Arthrobacter aurescens*, *Bacillus pumilus*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter globiformes*, *Micrococcus luteus*, *Achromobacter xyloxidans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter globiformis*.

Данные, полученные в ходе наших экспериментов, были сверены с результатами, полученными методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов показал совпадение по определению десяти из исследованных видов с результатами, полученными методом MALDI-TOF. В двух случаях нам удалось уточнить данные, полученные методом масс спектроскопии.

По результатам сравнения было выяснено, что оба метода имеют хорошую достоверность данных.

Список использованных источников

1. MGislin, D. Antibacterial activity of soil bacteria isolated from Kochi, India and their molecular identification / D. Gislin, D. Sudarsanam // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2018. – № 4. – С. 24–26.
2. Патрушев, Л. И. Экспрессия генов: монография / Л. И. Патрушев // Наука. - 2000. – С. 830.
3. Суворов, А.Н. Мир микробов и человек / А.Н. Суворов // Природа. – 2015. – №5. – С. 11-19.
4. Симонова, Е. В. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека / Е. В. Симонова, О. А. Пономарева // Сиб. мед. журн. – 2008. - №8. – С. 20-25.
5. Обухова, О. В. Экологическая обусловленность факторов патогенности условно-патогенной микрофлоры / О. В. Обухова, В. Ф. Зайцев // Астраханский вестник экологического образования. – 2015. – №. 1 – С. 31.
6. Кулясов, П. А. Роль гнилостных микроорганизмов в жизни живых существ / П. А. Кулясов // Ветеринарна біотехнологія. – 2011. – №. 20. – С. 90-97.
7. McMichael, A. Микроорганизмы и человек: непрерывная борьба: система публикация Европейской обсерватории по системам и политике здравоохранения / А. McMichael // Системы здравоохранения и проблемы инфекционных заболеваний. – С. 65.
8. Абдугаффаров, С. О. Роль микрофлоры в жизнедеятельности человека / С. О. У. Абдугаффаров // Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования. – 2020. – №. 4. – С. 54-57.
9. Олескин, А. В. Сетевые структуры, социальная организация микроорганизмов и взаимоотношения микробиота-хозяин / А. В. Олескин // Вестник восстановительной медицины. – 2016. – №. 1. – С. 29-36.

10. Оганезова, И. А. Кишечная микробиота и иммунитет: иммуномодулирующие эффекты *Lactobacillus rhamnosus* GG / И. А. Оганезова // РМЖ. – 2018. – Т. 26, №. 9. – С. 39-44.
11. Andrey, A. The Study of Viral RNA Diversity in Bird Samples Using De Novo Designed Multiplex Genus-Specific Primer Panels / A. Andrey, E. Pimkina // *Advances in Virology*. – 2018. – № 10. – pp. 10–20.
12. Усманова, И. Н. Роль условно-патогенной микрофлоры полости рта в развитии воспалительных заболеваний пародонта и слизистой полости рта (обзор литературы)/ И. Н. Усманова // *Человек. Спорт. Медицина*. – 2015. – Т. 15, №. 2. – С. 37-43.
13. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева — Москва : Изд-во МГУ, 2004. — 448 с.
14. Госманов, Р. Г. Микробиология: учебное пособие / Р. Г. Госманов - Санкт-Петербург: Изд-во Лань, 2019. – 496 с.
15. Земсков, А. М. Основы микробиологии и иммунологии: учебник / А. М. Земсков [и др.] - Москва: КноРус., 2019. – 29 с.
16. Tortora, G. J. *Microbiology: An Introduction* / G. J. Tortora - Palgrave, 2019 – 321 с.
17. Леванова, Л. А. Систематика, таксономия и классификация бактерий / Л. А. Леванова, Ю. В. Захарова // *Фундаментальная и клиническая медицина*. – 2017. – Т. 2, №. 1. – С. 91-101.
18. Ковалева, И. А. Методы идентификации роста *Bacillus*/ И. А. Ковалева, Д. В. Никулина // *Биоразнообразие, биоресурсы, вопросы химии, биотехнологии и здоровье населения Северо-Кавказского региона*. – 2017. – Т. 42, №4 - С. 191-194.
19. Хаффарессас, Я. Современные методы идентификации микроорганизмов / Я. Хаффарессас // *Новый взгляд. Международный научный вестник*. – 2017. - №17. – С. 6-14.

20. Бабичев, С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для медицинских вузов / С. А. Бабичев, А. И. Коротяев – Санкт-Петербург, изд-во СпецЛит, 2017. – 28 с.
21. Хаптанова, Н. М. Особенности серологической диагностики листериоза (обзор литературы) / Н. М. Хаптанова // Acta Biomedica Scientifica. – 2019. – Т. 4, №. 1. – С. 43-49.
22. Stewart, L.D. Development of a novel immunochromatographic lateral flow assay specific for *Mycobacterium bovis* cells and its application in combination with immunomagnetic separation to test badger faeces / L.D. Stewart // BMC. – 2019. – №. 2. – pp. 456-457.
23. Глушанова, Н. А. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов / Н. А. Глушанова, А. И. Блинов, Н. Б. Алексеева // Медицина в Кузбассе. – 2015. – № 2. – С. 36-41.
24. Lee, M. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in Enterobacteriaceae: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution / M. Lee, Chung H. S. // Journal of microbiological methods. – 2015. – Т. 112. – pp. 87-91.
25. Alegría-Puig, C. R. Evaluation of Vitek-MS™ and Microflex LT™ commercial systems for identification of *Acinetobacter calcoaceticus*–*baumannii* complex / C. R. Alegría-Puig, F. Marco // Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. – 2020. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32307128/>
26. Кандыбович, Е. А. Оптоволоконные биосенсоры. / Е. А. Кандыбович, Т. А. Кузнецова // Новые направления развития приборостроения: материалы 9-й международной научно-технической конференции молодых ученых и студентов – 2016. – Т. 1. – С. 232-233.
27. Pahumunto, N. Fermented milk containing a potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* SD11 with maltitol reduces *Streptococcus mutans*: A double-blind, randomized, controlled study / N. Pahumunto, S. Piwat // Journal of Dental Sciences. – 2020. – № 6. – pp. 23-28.

28. Teanpaisan, R. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species / R. Teanpaisan, G. Dahlen // *Oral Microbiol Immunol.* – 2016. – № 21. – pp. 79-84.
29. Piwat, S. 16S rRNA PCR-denaturing gradient gel electrophoresis of oral *Lactobacillus casei* group and their phenotypic appearances / S. Piwat, R. Teanpaisan // *ISRN Microbiol.* – 2017. – № 13. – pp. 1–6.
30. Глушанова, Н. А. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов / Н. А. Глушанова, А. И. Блинов, Н. Б. Алексеева // *Медицина в Кузбассе.* – 2015. – № 2. – С. 36-41.
31. Кирилюк, А.А. Применение методов масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) в современной клинической лаборатории – обзор приложений, преимущества использования, современные подходы и возможности./ А.А. Кирилюк – Москва, ABSciex, 2011. - С. 50.
32. Guttman, B. *Genetics* / B. Guttman, A. Griffiths, D. Suzuki, T. Cullis. – UK: Oneworld Publications, Oxford, 2004. – С. 250.
33. Куйбагаров, М. А. Генетическая идентификация бактерий коллекционных штаммов на основе проведения анализа нуклеотидной последовательности 16srRNA гена / М. А. Куйбагаров // *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина.* – 2013. – №. 2. – С.77.
34. Ребриков, Д. В. ПЦР в реальном времени/ Д. В. Ребриков - Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 223 с.
35. Евдокимова, О. В. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦР // *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2016. – Т. 21. – С. 53-63.
36. Watts, G. S. 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria / G. S. Watts // *Journal of applied microbiology.* – 2017. – Т. 123, №. 6. – С. 1584-1596.

37. Liu, Y. Genotypic differences in CC224, CC363, CC449 and CC446 of *Moraxella catarrhalis* isolates based on whole genome SNP, MLST and PFGE typing / Y. Liu, S. Yu // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2020. – № 310.
38. McMahon, T. C. Multiplexed single intact cell droplet digital PCR (MuSIC ddPCR) method for specific detection of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) in food enrichment cultures/ T. C. McMahon // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Т. 8. – С. 332.
39. Dec, M. 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry / M. Dec // *BMC microbiology*. – 2016. – Т. 16, №. 1. – С. 105.
40. ПДРФ [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/R..>
41. Andrey, A. The Study of Viral RNA Diversity in Bird Samples Using De Novo Designed Multiplex Genus-Specific Primer Panels / A. Andrey, E. Pimkina // *Advances in Virology*. – 2018. – № 10. – С. 10–20.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е.И. Шишацкая

« 25 » июня 20 21 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Сравнительная оценка различных методов идентификации непатогенных
бактерий

Научный руководитель



доцент, к.б.н.

О.А. Гусейнов

Выпускник



К.А. Бурдукова

Красноярск 2021