



На правах рукописи

ИВАНОВА

Любовь Алексеевна

**РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО МАТРИКСА В
БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ, ИНДУЦИРОВАННОЙ
ПЛАНКТОННОЙ КУЛЬТУРОЙ
BACILLUS CEREUS 4В**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Гатчина

2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Кульминская Анна Алексеевна**.

Официальные оппоненты:

профессор, доктор физико-математических наук **Касьяненко Нина Анатольевна**, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров физического факультета, г. Санкт-Петербург;

профессор, доктор биологических наук **Кондратьева Любовь Михайловна**, федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской академии наук», главный научный сотрудник лаборатории гидрологии и гидрогеологии, г. Хабаровск.

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», г. Санкт-Петербург.

Защита состоится **«27» июня 2025 г.** в 12:30 на заседании диссертационного совета **У.1.5.2.22** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО СПбПУ) (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/independent-award-academic-degrees/defences-calendar/> ФГАОУ ВО СПбПУ.

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Способность живых клеток осаждать неорганические минералы обнаружена во всех таксономических доменах: бактерии, археи, грибы, растения и животные способны индуцировать биоминерализацию (БМ). Бактериальная БМ является наиболее разнообразной как в отношении механизмов, так и в отношении диапазона полученных минералов в ходе осаждения [Hoffmann T.D., 2021]. Продукты бактериальной БМ составляют значительную часть геологических формаций и осадочных пород [Banks E.D., 2010], играя ключевую роль в формировании литосферы и представляя значительный интерес для реконструкции палеонтологических процессов [Caro E., 2022]. Те же механизмы, участвующие в создании природных структур, обуславливают серьёзные клинические проблемы, связанные с неконтролируемым течением БМ в клинической практике: инкрустация бактериальных биопленок (БП) приводит к серьёзным осложнениям при катетеризации пациентов [Milo S., 2017], осложняет течение бактериальных инфекций, таких как тонзиллит [Abu Bakar M., 2018] или простатит [Mazzoli S., 2010] и способствует образованию зубного камня [Akcalı A., 2018].

В настоящий момент большое количество исследований направлено на разработку природоподобных технологий с использованием микробного осаждения CaCO_3 (МИОК) в области строительства и экологии. Восстановление бетонных конструкций [Zhang K., 2023], укрепление и стабилизации почв [Zhang K., 2023], а также очистка сточных вод [Hammes F., 2003] и биоремедиация [Kumari D., 2016] — это те отрасли, где МИОК-технологии наиболее развиты. Параллельно ведутся работы по созданию антиминерализационных покрытий для медицинских катетеров и имплантатов, направленных на ингибирование инкрустации биопленок [Rajaramon S., 2023].

Несмотря на прогресс в управлении БМ, ключевые аспекты процесса остаются недостаточно изученными. К числу наименее исследованных относится роль внеклеточного матрикса (ВКМ) в процессе БМ. Исследование механизмов БМ является важной и **актуальной задачей**, поскольку может способствовать разработке новых более эффективных методов лечения заболеваний, связанных с образованием инкрустированных БП, созданию экологически безопасных материалов и технологий, а также уточнению вклада микробных сообществ в геохимические циклы и эволюцию биосферы.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на то, что бактерии считаются одноклеточными организмами, в природе они образуют сложные, дифференцированные многоклеточные сообщества за счет выделения в межклеточное пространство полимерных молекул, образующих БП. Полисахариды, белки и

внеклеточная ДНК (вДНК) – являются основными компонентами ВКМ, и обеспечивают для колонии не только более высокую адгезию к субстрату, но и существенно (до 1000 раз) более высокую резистентность к антибиотикам и антибактериальным химическим агентам [Vohra M, 2024]. Наблюдение, что минеральный компонент нередко становится частью БП, было сделано в конце 1990-х годов [Stickler D., 2020]. С тех пор было проведено множество исследований [Keren-Paz A, 2020], в том числе в области участия отдельных компонентов ВКМ в процессе бактериальной БМ.

Ранние гипотезы связывали БМ с пассивной нуклеацией кристаллов на клеточной стенке через электростатические взаимодействия ионов металлов с анионными группами поверхностных гликопротеинов и пептидогликанов. Однако со временем накапливались данные о том, что отрицательного заряда поверхности клетки недостаточно [Zhang W., 2018], и для такого типа взаимодействия требуется большое количество условий: определенная стереохимическая схожесть поверхностных полимеров с поверхностью кальцита, высокая плотность отрицательно заряженных функциональных групп поверхностных биомолекул, имеющих подходящие константы кислотности, а также отсутствие большого количества аминогрупп. Позже Бунделева с соавт. [Bundeleva I.A., 2012] предположили, что существуют механизмы защиты клеток от отложения минералов, и предложили идею отложения кристаллов на некотором расстоянии от поверхности клетки.

Современные данные свидетельствуют [Keren-Paz A, 2020] о концептуальном сдвиге: БМ рассматривается не как побочный продукт метаболизма, а как биологически регулируемый процесс, интегрированный в развитие БП, в котором продукты БМ выступают консервативным элементом их морфогенеза. Несмотря на то, что становится понятно, что образование БП и БМ являются сложными взаимовлияющими процессами, механизмы их взаимодействия пока до конца неясны. Наиболее перспективной, по нашему мнению, гипотезой регуляции процесса БМ бактериальными клетками является участие отдельных макромолекул ВКМ в процессе нуклеации и осаждения CaCO_3 .

Эксперименты последних лет выявили корреляцию между составом ВКМ и морфологией биогенного CaCO_3 : белки и полисахариды матрикса обнаруживают в качестве включений в кристаллических структурах. Однако в большинстве работ фокус ограничен характеристикой кристаллических параметров (полиморфной модификацией) и морфологией биогенных минералов без анализа мезоструктурной организации или кинетики кристаллизации. Прямые доказательства каталитической роли ВКМ-компонентов в нуклеации CaCO_3 в настоящий момент отсутствуют. Особый интерес представляет вДНК — универсальный и консервативный элемент БП. Однако степень, в которой вДНК и процесс БМ могут быть связаны друг с другом, остается неясной и требует дополнительных исследований.

Цель и задачи исследования

Цель: исследование взаимного влияния процессов биоминерализации и образования внеклеточного матрикса на модели планктонной культуры *Bacillus cereus* 4В.

Задачи:

1. Исследование состава и роли основных компонентов внеклеточного матрикса в процессе бактериальной биоминерализации.
2. Исследование влияния состава культуральной среды на поведение бактериальных клеток и их способность вызывать минерализацию.
3. Исследование эволюции кристаллической и надмолекулярной структуры, а также полиморфных превращений и морфологии осадков CaCO_3 в процессе биоминерализации.
4. Сравнение процессов осаждения и структурных параметров кристаллов в бактериальной среде и в отсутствие клеток.
5. Исследование влияния ДНК-компоненты на процесс осаждения и структуру CaCO_3 в бактериальной среде и среде без бактерий.

Научная новизна

В настоящей работе впервые была показана ключевая роль внеклеточной ДНК, входящей в состав ВКМ, в индукции осаждения CaCO_3 в процессе бактериальной БМ. Также впервые были представлены данные об эволюции кристаллической и надмолекулярной структуры биогенного CaCO_3 в процессе БМ.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты представленной работы обладают значительной теоретической значимостью, поскольку процесс БМ является широко распространённым явлением, наблюдаемым в различных биологических системах, и наиболее древним среди всех таксономических групп. Полученные данные об участии ВКМ в процессе БМ открывают новые горизонты для изучения возможных эволюционных механизмов и адаптационных стратегий живых организмов.

С практической точки зрения, понимание механизмов БМ имеет важное значение для развития современных инженерных технологий, которые, несмотря на перспективность, нуждаются в разработке новых подходов [Jain S., 2021]. Кроме того, полученные в настоящей работе результаты могут быть использованы в разработке новых стратегий борьбы с инкрустированными БП: а именно, использование препаратов ДНКазы I при таких заболеваниях как муковисцидоз, тонзиллит или в других случаях патологической кальцификации бактериальной природы.

Методология и методы исследования

В настоящей работе был использован широкий спектр методов, включающих классические способы ведения бактериальных культур, методы белкового анализа, а также микроскопические методы: атомно-силовой и световой микроскопии, конфокальной микроскопии с флуоресцентным окрашиванием – для исследования процессов формирования ВКМ. Для исследования структуры осадков CaCO_3 , были использованы такие физические методы, как: рентгенофазовый анализ, инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием, растровая электронная микроскопия, а также методы малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей.

Положения, выносимые на защиту

1. В планктонной культуре *Bacillus cereus* 4В образуется внеклеточный матрикс, участвующий в процессе биоминерализации и включающий внеклеточную ДНК, полисахариды и белки.
2. Состав питательной среды для биоминерализации CaCO_3 , индуцированной планктонной культурой *Bacillus cereus* 4В, оказывает значительное влияние как на состав и количество компонентов внеклеточного матрикса, так и на выход минерализованных осадков.
3. Трансформация биогенного CaCO_3 проходит по пути «аморфный карбонат кальция → ватерит → кальцит» и сопровождается значительным увеличением характерных размеров фрактальных кластеров и уплотнением их структуры.
4. Осаждение CaCO_3 в бесклеточной системе существенно отличается от биоминерализации в клеточной бактериальной системе.
5. Внеклеточная ДНК играет ключевую роль в процессе биоминерализации: ускоряет осаждение CaCO_3 в клеточной и бесклеточной системах, а ее фрагментация останавливает процесс биоминерализации и влияет на надмолекулярную и кристаллическую структуру осажденного CaCO_3 .

Личный вклад соискателя

Автором были проанализированы и описаны литературные данные по теме диссертации, разработан дизайн исследования и проведены эксперименты, подготовлены образцы для физико-химических исследований. Полученные результаты были проанализированы и обобщены автором диссертации, на основании чего были сформулированы гипотезы и подготовлены публикации, а также доклады на конференциях. Анализ белков ВКМ был выполнен Я. А. Забродской (НИИ гриппа, Санкт-Петербург). Обработка данных ИК-спектроскопии и РФА была

проведена А. Е. Баранчиковым и А. Д. Япрынцевым (ИОНХ им. Курнакова, г. Москва). Обработка данных малоуглового нейтронного рассеяния (МУРН) была проведена Г. П. Копицей (НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, г. Гатчина), данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) Д. В. Лебедевым (НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, г. Гатчина) при участии Ю. Е. Горшковой (ОИЯИ г. Дубна).

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных в ходе работы данных подтверждается применением широкого спектра современных методов исследования, их воспроизводимостью и согласованностью.

Материалы диссертации были представлены на VIII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020г.), международной конференции «Condensed matter research at the IBR-2» (Дубна, в 2020г. и 2022 г.), VIII Всероссийском молодежном научном форуме «Open Science» (Гатчина, 2021г.), на международной конференции по нейтронному рассеянию «ICNS 2022» (Буэнос-Айрес, 2022г.), VI Международной конференции VII Съезда биохимиков России (Сочи, 2022г.), на международной конференции VI научной конференции по малоугловому рассеянию и рефлектометрии "МУРомец-2023" (Гатчина, 2023г.), конференциях по использованию рассеяния нейтронов в исследовании конденсированных сред «РНИКС-2021» и «РНИКС-2023» (Екатеринбург, 2021г. и 2023г.), конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление»: 77-я Всероссийская школа конференция молодых ученых (Нижний Новгород, 2024г.), 16-ой международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2024г.), всероссийском форуме молодых исследователей ХимБиоSeasons (Калининград, 2025г.), а также на научных семинарах ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ и кафедры ЯФМИ физического факультета СПбГУ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы, иллюстрирована 31 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы, включающего 242 научных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Условия культивирования бактериальных штаммов

Составы всех сред, используемых для получения осадков CaCO_3 в культуральных жидкостях, содержащих бактерии, и в бесклеточных системах, а также их обозначения приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Обозначения используемых культуральных сред и их компоненты

Обозначения среды	Состав среды
Эксперименты с участием клеток <i>B. cereus</i> 4В	
В4	Дрожжевой экстракт (4г/л) + глюкоза (10 г/л)
В4_1хСаUr	В4 + CaCl_2 (2,5 г/л) + мочевины (2,5 г/л)
В4_10хСаUr	В4 + CaCl_2 (25 г/л) + мочевины (25 г/л)
В4_10хСа	В4 + CaCl_2 (25 г/л)
В4_1хUr	В4 + мочевины (2,5 г/л)
В4_10хUr	В4 + мочевины (25 г/л)
В4_1хСаUr + ДНКза	В4 + CaCl_2 (2,5 г/л) + мочевины (2,5 г/л) + ДНКза I (0,25 мг /мл)
В4_1хСаUr+лиз.кл.	В4 + CaCl_2 (2,5 г/л) + мочевины (2,5 г/л) + разрушенные с помощью УЗ клетки
В4_10хСаUr+лиз.кл.	В4 + CaCl_2 (25 г/л) + мочевины (25 г/л) + разрушенные с помощью УЗ клетки
Эксперименты с бесклеточной системой	
1хСа	Супернатант после роста клеток в среде В4_1хUr + CaCl_2 (2,5 г/л)
10хСа	Супернатант после роста клеток в среде В4_10хUr + CaCl_2 (25 г/л)
1хСа + ДНК (геном.)	Супернатант после роста клеток в среде В4_1хUr + CaCl_2 (2,5 г/л) + ДНК спермы лосося (30 мкг/мл)
10хСа + ДНК (геном.)	Супернатант после роста клеток в среде В4_10хUr + CaCl_2 (25 г/л) + ДНК спермы лосося (30 мкг/мл)
1хСа + ДНК (плазм.)	Супернатант после роста клеток в среде В4_1хUr + CaCl_2 (2,5 г/л) + ДНК бактериальная плазмидная (30 мкг/мл)
10хСа + ДНК (плазм.)	Супернатант после роста клеток в среде В4_10хUr + CaCl_2 (25 г/л) + ДНК бактериальная плазмидная (30 мкг/мл)

Все полученные данные по росту микроорганизмов были подвергнуты статистической обработке. В частности, все эксперименты состояли как минимум из трех независимых повторностей, для них рассчитывали средние значения, характеризующие центральную тенденцию, и стандартные отклонения, отражающие разброс данных относительно среднего.

1.2. Микроскопические исследования

Световая микроскопия: образцы бактериальных клеток с ВКМ, полученные на разных стадиях роста клеток были нанесены на предметное стекло и окрашены 30 мкл 0,1% водного раствора Кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 3–5 мин, после чего визуализированы с помощью оптического флуоресцентного микроскопа Leica DM2500 (ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ).

Атомно-силовая микроскопия: поверхность бактерий изучали с помощью сканирующего зондового микроскопа NT-MDT Solver Bio (ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ). Клетки из каждой аликвоты наносили на предметное стекло и промывали водой MilliQ для удаления солей. Измерения проводили в полуконтактном режиме с помощью зонда HSG01 параллельно с визуализацией на оптическом стереоскопическом микроскопе СМЭС-1.

Флуоресцентная микроскопия: бактериальные клетки, ВКМ и минеральные осадки, образовавшиеся на разных стадиях клеточного роста, визуализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ). Для обнаружения вДНК образцы окрашивали реагентом sytox Green Ready Flow (флуоресценция 488 нм, эмиссия 505–555 нм) и 7AAD (флуоресценция 543 нм, эмиссия 630–670 нм) согласно инструкции производителя. Для выявления белковых и амилоидных структур клетки окрашивали тиофлавином Т (флуоресценция 458 нм, эмиссия 470–500 нм), бромфеноловым синим (флуоресценция 633 нм, эмиссия 660–800 нм) и Конго красный (флуоресценция 514 нм, эмиссия 600–650 нм). Карбонат кальция определяли методом автофлуоресценции (флуоресценция 405 нм, эм. 420–480 нм).

Растровая электронная микроскопия (РЭМ) и энергодисперсионный рентгеновский анализ (ЭДС): Для исследования морфологии осадков CaCO_3 были получены электронные микрофотографии с использованием растрового электронного микроскопа Carl Zeiss NVision 40 с полевой эмиссией Шоттки (ИОНХ им. Курнакова, г. Москва). Образцы без покрытия наносились в виде порошка на проводящую углеродную ленту. Изображения были получены при ускоряющем напряжении 1 кВ, рабочем расстоянии 3,5 мм с использованием детектора вторичных электронов (Everhart-Thornley) при увеличении $\times 1000$ – 100000 . Энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (ЭДС) проводили с использованием ЭДС-детектора Oxford Instruments X-Max при ускоряющем напряжении 20 кВ, рабочем расстоянии 5 мм, калиброванном по кобальтовому стандарту. Результаты ЭДС обрабатывали с помощью программного обеспечения INCA.

1.3. Исследования структуры осадков CaCO_3

Рентгенофазовый анализ: для исследования кристаллической структуры осадков,

полученных в процессе БМ был использован метод порошкового рентгеноструктурного анализа (РФА) образцов, который проводили на дифрактометре Rigaku Miniflex 600 (геометрия Брэгга-Брентано) с Ni-фильтрованным Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) излучением и детектором LYNXEYE (ИК РАН, г. Москва). Дифрактограммы записывали в диапазоне $10\text{--}70^\circ 2\theta$ с шагом $0,02^\circ$ и временем сбора $0,3 \text{ с/шаг}$. Модели структуры были получены из Открытой базы данных кристаллографии.

Инфракрасная Фурье-спектроскопия: для исследования фазового состава осадков CaCO₃ получали спектры инфракрасной Фурье-спектроскопии образцов на ИК Фурье-спектрометре ALPNA (Brucker) (ИОНХ им. Курнакова, г. Москва) в режиме ослабленного полного отражения в диапазоне $400\text{--}4000 \text{ см}^{-1}$ с разрешением $1,5 \text{ см}^{-1}$.

Анализ малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР): измерения МУРР проводились с использованием системы Xeuss 3.0 SAXS/WAXS (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия), работающей в точечной геометрии и с использованием микрофокусного рентгеновского генератора GeniX 3D с Cu K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) в диапазоне 30° . Режим W/30 мкм. Спектрометр был оснащен мобильным детектором Eiger2 R1M с чувствительной областью $77,1 \times 79,7 \text{ мм}$ (размер пикселя 75 мкм). Измерения проводились на трех расстояниях от образца до детектора ($45, 400$ и 4500 мм) в вакууме при комнатной температуре для получения дифференциального сечения малоуглового рассеяния $d\Sigma(q)/d\Omega$, нормированного на аморфный углерод.

Анализ малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН): анализ образцов CaCO₃ методом малоуглового рассеяния нейтронов проводился на времяпролетном спектрометре ЮМО на импульсном реакторе ИБР-2 (Дубна, Московская область, Россия). Стандартное время сбора данных на образец составляло 40 минут. В наших экспериментах использовались два кольцевых He³-детектора на расстояниях 4 м и 13 м от положения образца. Интенсивность рассеяния (дифференциальное сечение на объем образца) регистрировали как функцию модуля передачи импульса $q = (4\pi/\lambda) \cdot \sin(\theta/2)$, где θ — угол рассеяния, λ — длина волны падающего нейтрона. Распределение пучка падающих нейтронов обеспечивает доступный диапазон длин волн $0,05 \div 0,8 \text{ нм}$, что соответствует диапазону передачи импульса $q \cdot 10^{-2} \div 5 \text{ нм}^{-1}$. Обработка необработанных данных проводилась с помощью программы SAS (<https://zenodo.org/record/2561236#.YzqZInZByUk>). Измеренные спектры МУРН были переведены в абсолютную шкалу путем нормировки на сечение некогерентного рассеяния стандартного образца ванадия. Дополнительно измеренные спектры корректировались с учетом рассеяния на установке и прямом пучке, а также фона. Итоговые кривые малоуглового рассеяния нейтронов представлены в абсолютном масштабе с вычетом фона.

Данные малоуглового рассеяния были аппроксимированы моделью Бьюкеджа, описывающей переход от поведения Гинье к степенному режиму для фрактальных рассеивателей с радиусами гирации R_g :

$$\frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = G \cdot \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) + \frac{B}{q^n} + I_{inc}, \quad (1) \quad \text{где} \quad q = \frac{q}{\left[\operatorname{erf}\left(\frac{q R_g}{6^{\frac{1}{2}}}\right)\right]^3} \quad (2)$$

– величина переданного импульса, нормированная на функцию ошибок.

Там, где это было возможно, использовался единый подход, предполагающий двухуровневую иерархию с более масштабным уровнем, представленным аппроксимацией Порода для рассеивателей с гладкой поверхностью.

$$\frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = G_0 \cdot \exp\left(\frac{-q^2 R_{g0}^2}{3}\right) + \left(\frac{B_0}{q_0^4} + G\right) \cdot \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) + \frac{B}{q^n} + I_{inc} \quad (3)$$

Для случая объемного фрактала характерный размер фрактальных кластеров R_c рассчитывался по формуле:

$$R_c = \left(\frac{n+2}{n}\right)^{\frac{1}{2}} \cdot R_g \quad (4)$$

В экспериментах с лизированными клетками для лучшего описания модели была также использована модель Бьюкеджа с той разницей, что рассматривалось до трех уровней иерархии:

$$\frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = G_0 \cdot \exp\left(\frac{-q^2 R_{g0}^2}{3}\right) + \left(\frac{B_0}{q_0^{n_0}} + G_1\right) \cdot \exp\left(\frac{-q^2 R_{g1}^2}{3}\right) + \left(\frac{B_1}{q_1^{n_1}} + G_2\right) \cdot \exp\left(\frac{-q^2 R_{g2}^2}{3}\right) + \frac{B}{q_2^4} + I_{inc} q_i = \frac{q}{\left[\operatorname{erf}\left(\frac{q R_{gi}}{6^{\frac{1}{2}}}\right)\right]^3}, \quad (5) \text{ где } G \text{ и } B \text{ — масштабные факторы Гинье и Порода соответственно, зависящие от плотности числа частиц и контраста, } R_g \text{ — радиус гирации.}$$

1.4. Анализ белков ВКМ, связанного с клетками *V. cereus*

Образцы ВКМ использовали для электрофоретического разделения белков и анализа протеома. Фрагменты геля, окрашенного Кумасси, вырезали, дважды промывали от красителя 30 мМ NH_4HCO_3 40% ацетонитрилом, после чего дегидратировали 100% ацетонитрилом и обрабатывали трипсином (Promega) (20 мкг/мл в 50 мМ NH_4HCO_3) при 37°C в течение 5 часов. Триптические пептиды смешивали с матрицей 2,5-DHB (Bruker), наносили на мишень и получали масс-спектры на масс-спектрометре MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker) в режиме положительных ионов. Для каждого спектра суммировали 5000 лазерных импульсов. Идентификацию белков проводили с использованием MASCOT (www.matrixscience.com) и базы данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Погрешность ограничивали 20 ppm. Окисление метионина и дезамидирование указывали как переменные модификации. Идентификацию считали достоверной ($p < 0,05$), если значение балла превышало пороговое значение.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Исследование процесса образования внеклеточного матрикса планктонной культуры *B. cereus* 4В

В соответствии с динамикой роста биомассы планктонной культуры *B. cereus* 4В в среде В4_10хСаUr (содержащей 25 г/л мочевины и CaCl_2), процесс минералообразования был разделен на 4 временных периода, которые далее были описаны по отдельности с помощью совокупности микроскопических методов.

Первый этап: лаг-фаза роста. На первом этапе роста *B. cereus* 4В в среде В4_10хСаUr мы наблюдали начало формирования ВКМ, в первую очередь, за счет секреции полисахаридов. К 15 часам роста планктонной культуры бактерии образовывали «завитки», при помощи амилоидных белков, которые окрашивались Конго красным, а также визуализировались с помощью АСМ. Также к концу первого периода роста была детектирована вДНК и автофлуоресценция CaCO_3 , которые были ко-локализованы.

Второй этап: экспоненциальный рост. Вторым этапом роста *B. cereus* 4В в среде В4_10хСаUr характеризовался агрегацией бактериальных клеток и уплотнением ВКМ за счет увеличения количества вДНК и амилоидных структур, окрашиваемых тиофлавином Т.

Третий этап: формирование кристаллов. В течение третьего периода *B. cereus* 4В в среде В4_10хСаUr происходило формирование кристаллических осадков CaCO_3 в составе ВКМ. В этот же период наблюдали дифференцировку бактериальных клеток БП.

Четвертый этап: агрегация клеток и осадка. После 33 часов культивирования *B. cereus* 4В в среде В4_10хСаUr были сформированы биогенные минералы CaCO_3 , которые содержали в себе бактериальные клетки, а также вДНК, окрашиваемую sytox Green и 7AAD (рис. 2). Осадки образовывали агрегаты между собой за счет амилоидных структур на поверхности, окрашиваемых бромфеноловым синим, Конго красным и тиофлавином Т (рис. 1).

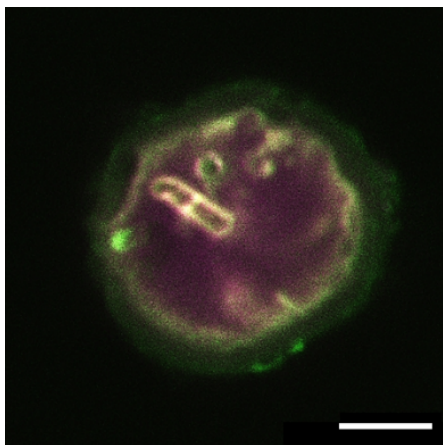


Рисунок 1 — Изображение биогенного минерала CaCO_3 , осажденного *B. cereus* 4В в процессе БМ в среде В4_10хСаUr, полученное с помощью конфокальной микроскопии, на четвертой стадии роста (52 часа после инокуляции) с окраской 7AAD (ДНК, розовый цвет) и тиофлавином Т (амилоидные структуры, зеленый цвет). Масштабная линейка соответствует 5 мкм

2.2. Влияние компонентов среды В4 на рост биомассы бактерий, значение pH среды и образование внеклеточного матрикса

Влияние отдельных компонентов культуральной среды, а именно мочевины и CaCl_2 , на формирование ВКМ и течение процесса БМ исследовали в тех же временных периодах, что и течение БМ в среде В4_10хСаUr, опираясь на кривые роста биомассы и изменение значения pH среды.

Первый этап: 0 - 15 часов роста. На первом этапе роста *B. cereus* 4В значительное влияние на формирование ВКМ оказало присутствие избытка Ca^{2+} в культуральной жидкости: в присутствии 10-кратного добавленного CaCl_2 в среде В4_10хСа, как и в среде В4_10хСаUr, способствовало удлинению лаг-фазы до 15 часов и формированию «завитков», наблюдаемых с помощью АСМ (рис. 2А), и отсутствующих в средах без добавления кальция. Добавление кальция также способствовало секреции экзополисахаридов, которые окрашивались кристаллическим фиолетовым и не связывались с ДНК- и белково-специфическими красителями (рис. 2Б).

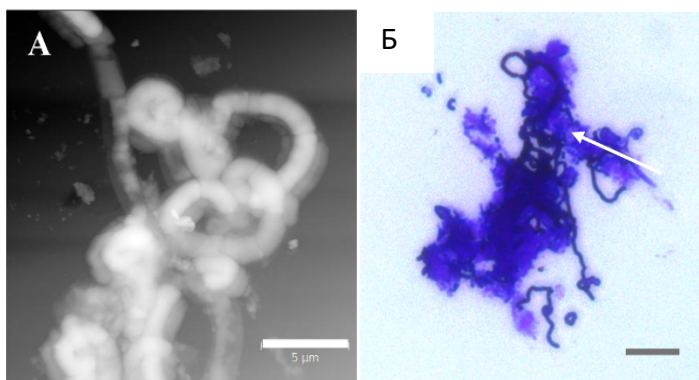


Рисунок 2 — Изображение *B. cereus* 4В, в среде В4_10хСа: А: полученное методом АСМ, после 6 часов инокуляции; Б: полученное методом световой микроскопии с окрашиванием кристаллическим фиолетовым, после 15 часов инокуляции; масштабные линейки соответствуют 5 мкм

Второй этап: от 15 до 24 часов. Второй период культивирования *B. cereus* 4В в средах с мочевиной характеризовался активным формированием ВКМ, преимущественно за счет полисахаридов. В свою очередь вДНК отсутствовала в среде В4_10хUr, но идентифицировалась в небольшом количестве в среде В4_10хСа.

Третий этап: от 24 до 33 часов. Третий период роста *B. cereus* 4В характеризовался увеличением pH среды в культуральных жидкостях, содержащих мочевины, однако процесс БМ протекал только в среде В4_10хСаUr и отсутствовал в других средах (В4, В4_10х и В4_10хСаUr).

Четвертый этап: более 33 часов. Наличие или отсутствие мочевины, оказало существенное влияние на сроки споруляции клеток в четвертом периоде культивирования *B. cereus* 4В. Неспорулирующие клетки *B. cereus* 4В в средах В4_10хСаUr и В4_10хUr наблюдались после 50 часов, в то время как в средах В4 и В4_10хСа споруляция завершалась к 40 часам роста клеток.

2.3. Анализ белков ВКМ, связанного с клетками *B. cereus* 4В

Исследование белкового состава ВКМ в средах различного состава было проведено методом электрофореза в ПААГ с последующей масс-спектрометрией (рис. 3) для образцов 12 и 30 часов культивирования *B. cereus* 4В. Масс-спектрометрия в образцах, полученных из сред В4_10хСаUr и В4_10хUr через 30 часов идентифицировала различные изоформы белка FtsN и марганец-содержащей супероксид дисмутазы, а также внеклеточную металлопротеазу М4, участвующую в модификации белков матрикса, вызывая конформационные изменения и образование амилоидов. В образцах бактерий, выращенных в среде В4_10хСа, были обнаружены белки семейства TerD (кальцийсвязывающие мембранные белки) и белки защиты от голодания/стационарной фазы ДНК.

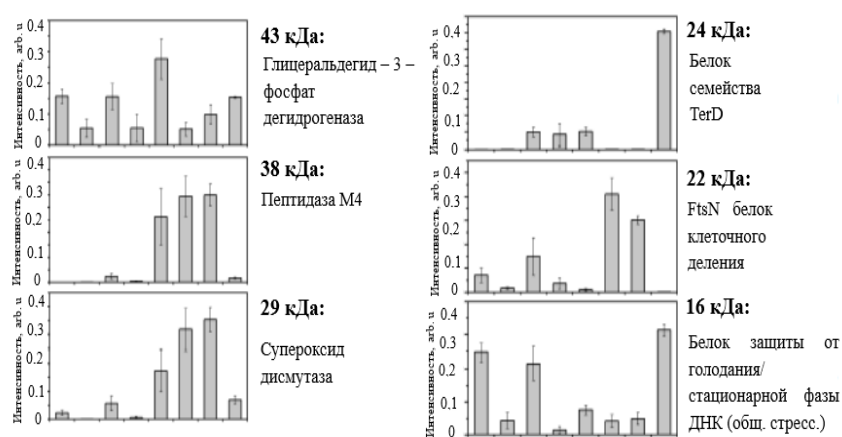


Рисунок 3 — Анализ белков ВКМ, связанных с клетками *B. cereus* 4В после роста в течение 12 и 30 часов в четырех средах: денситометрический анализ зон, различающихся по интенсивности цвета

2.4. Исследование структуры осадков CaCO_3 в процессе биоминерализации, индуцированной планктонной культурой *B. cereus* 4В

Образцы осадков CaCO_3 , полученных при росте планктонной культуры *B. cereus* 4В в среде В4_10хСаUr в течение 14 дней, анализировали методами инфракрасной Фурье-спектроскопии (ИК) (рис. 4 А), рентгенофазового анализа (РФА) (рис. 4 Б), сканирующей электронной микроскопии (РЭМ) (рис. 4 В), а также методом малоуглового нейтронного рассеяния (МУРР). Эволюция кристаллической и надмолекулярной структуры осажденного в процессе БМ CaCO_3 проходила следующим образом: осадки, состоящие преимущественно из АКК осаждались в виде фрактальных агрегатов, образующих кластеры размером в сотни ангстрем с фрактальной размерностью около 2,7. Трансформация полиморфов CaCO_3 проходила по пути АКК-ватерит-кальцит в течение 14 суток и сопровождалась значительным увеличением характерных размеров фрактальных кластеров, а также уплотнением их структуры.

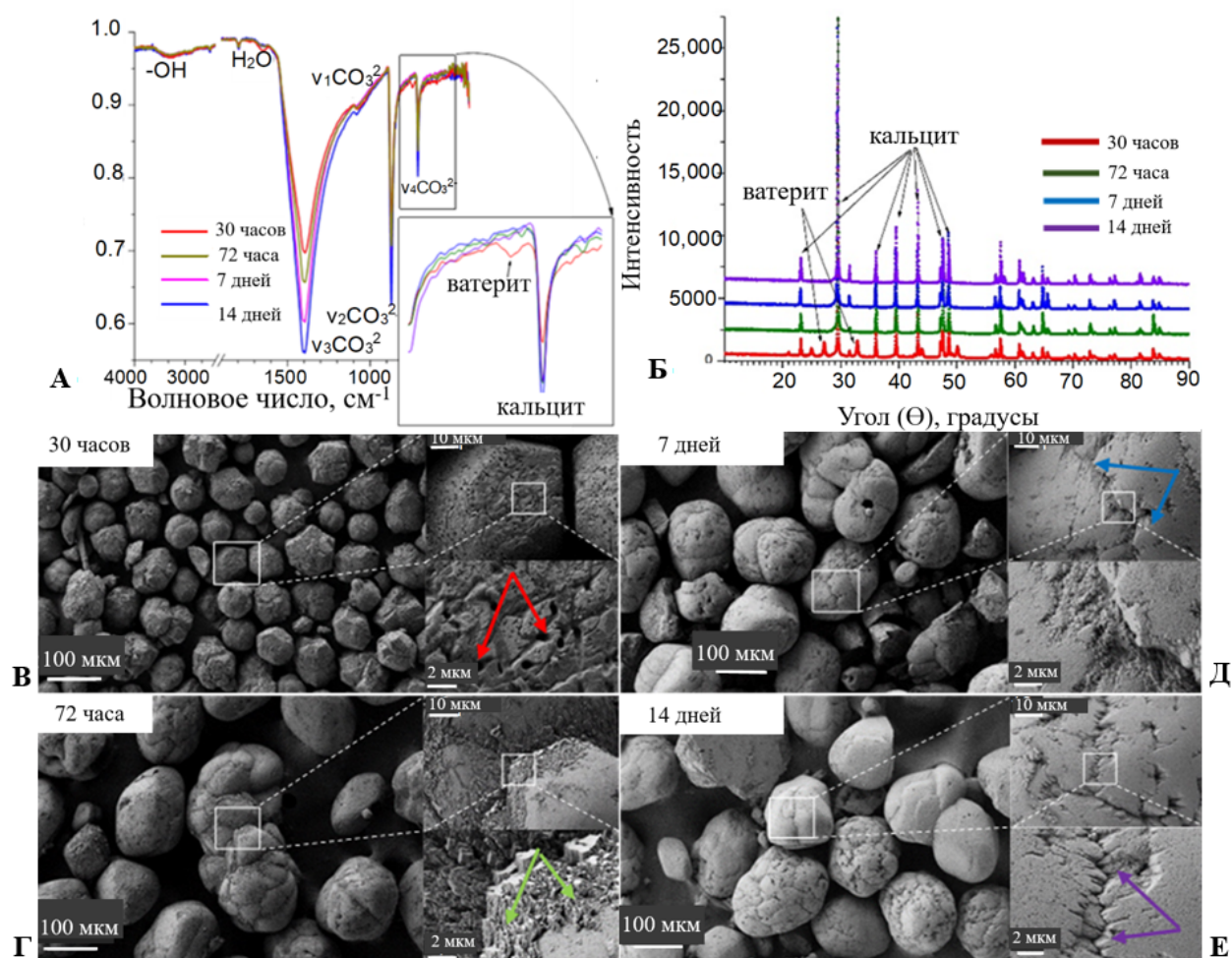


Рисунок 4 — Анализ осадков CaCO_3 , образовавшихся при инокуляции *B. cereus* 4В в среде В4_10хСаUr в течение 14 дней: А: общие ИК-спектры осадков при разном времени роста бактерии; Б: рентгенограммы образцов полиморфов CaCO_3 в составе осадка, осажденного в процессе БМ *B. cereus* 4В; В-Е: РЭМ микрофотографии осадков разного времени отбора

2.5. Исследование структуры осадков CaCO_3 , полученных в процессе БМ, индуцированной планктонной культурой *B. cereus* 4В в среде В4_1хСаUr

Были проведены исследования структуры осадков CaCO_3 , полученных в среде с 10-кратным уменьшением концентрации кальция и мочевины (В4_1хСаUr) методами МУРР, ИК и РЭМ. Анализ спектров МУРР показал незначительное влияние десятикратного снижения концентрации CaCl_2 на мезомасштабную структуру осадков, а именно увеличение поверхностной фрактальной размерности с 2,69 до 2,75. Также было показано, что эволюция морфологии осадков, образованных в среде В4_1хСаUr была схожа с процессом формирования CaCO_3 в среде В4_10хСаUr, однако размер минералов в среднем был вдвое меньше и достигал 150–300 мкм, при этом процесс кристаллизации по пути «АКК → ватерит → кальцит» проходил быстрее.

2.6. Исследование структуры осадков CaCO_3 , образованных в системе без бактерий

Исследования структуры осадков, полученных в системе без бактерий, проводили, аналогично экспериментам в бактериальной системе методами РЭМ и МУРР, для двух концентраций кальция (2,5 г/л – 1хСа и 25 г/л – 10хСа), осаждение происходило в клеточном супернатанте без участия бактериальных клеток. Увеличение концентрации Ca^{2+} приводило к образованию более плотных и менее пористых осадков на первоначальном этапе: размер пор аморфного осадка возрастал от 200 нм для среды 10хСа до половины микрона в среде 1хСа. Через 2 часа осадки в обеих системах представляли собой кристаллические сферолиты размером не более 50 мкм, лишённые аморфной фазы, наблюдаемой в системах с бактериальными клетками, которые не образовывали агломераты. Данные МУРР для осадков в среде 10хСа соответствовали модели Бьюкейджа с параметром радиуса гирации 40 нм и фрактальной размерности поверхности - 2,8. Через 2 часа режима в области высоких значений переданного импульса составил около 5 нм, а фрактальная размерность — 2,26. Подобное уменьшение размерности по мере кристаллизации CaCO_3 характерно только для бесклеточной системы и не наблюдалось при биоминерализации, индуцированной бактериями. Снижение концентрации CaCl_2 и мочевины при образовании осадков существенно повлияло на их мезомасштабную структуру, которая также имела два уровня иерархии: верхний предел фрактального режима составил 3 нм, а фрактальная размерность - 2,53. Радиус гирации крупномасштабных рассеивателей составил около 46 нм.

2.7. Исследование роли ДНК-компоненты внеклеточного матрикса в процессе биоминерализации, индуцированной планктонной культурой *B. cereus* 4В

Было показано, что ДНК включается не только в биогенные минералы CaCO_3 в бактериальной системе (как на рис.2), но и в абиогенные кристаллы, осажденные в бесклеточной среде (рис. 5).

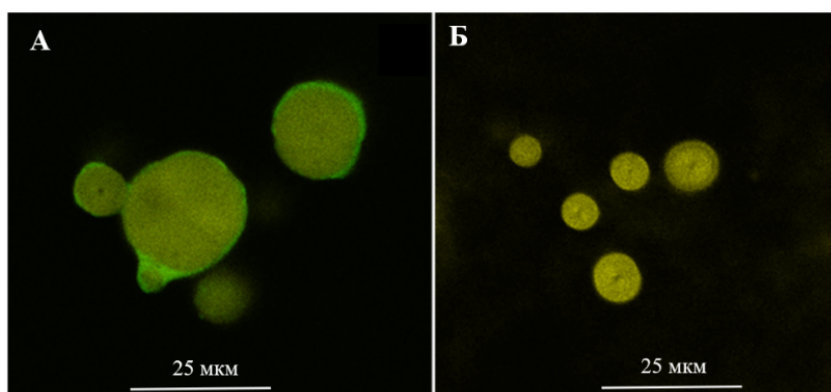


Рисунок 5 — Изображение конфокальной микроскопии с окрашиванием sytox green осадков CaCO_3 , полученных в бесклеточной системе: А: с добавленной ДНК спермы лосося; Б: без добавленной ДНК.

Для исследования течения процесса БМ в отсутствии ДНК-компоненты ВКМ использовали фермент ДНКазу I, который добавляли в среду B4_1xCaUr каждые 3 часа на протяжении 33 часов культивирования *B. cereus* 4В. На рисунке 7 приведены конфокальные изображения образцов, взятых через 44 часа культивирования *B. cereus* 4В в среде B4_1xCaUr с добавлением ДНКазы I и без нее (рис. 6) и окрашенных флуоресцентными красителями sytox green и бромфеноловым синим. Было показано, что исключение ДНК-компоненты ВКМ радикально замедлило процесс БМ, который был частично возобновлен после инактивации фермента в среде.

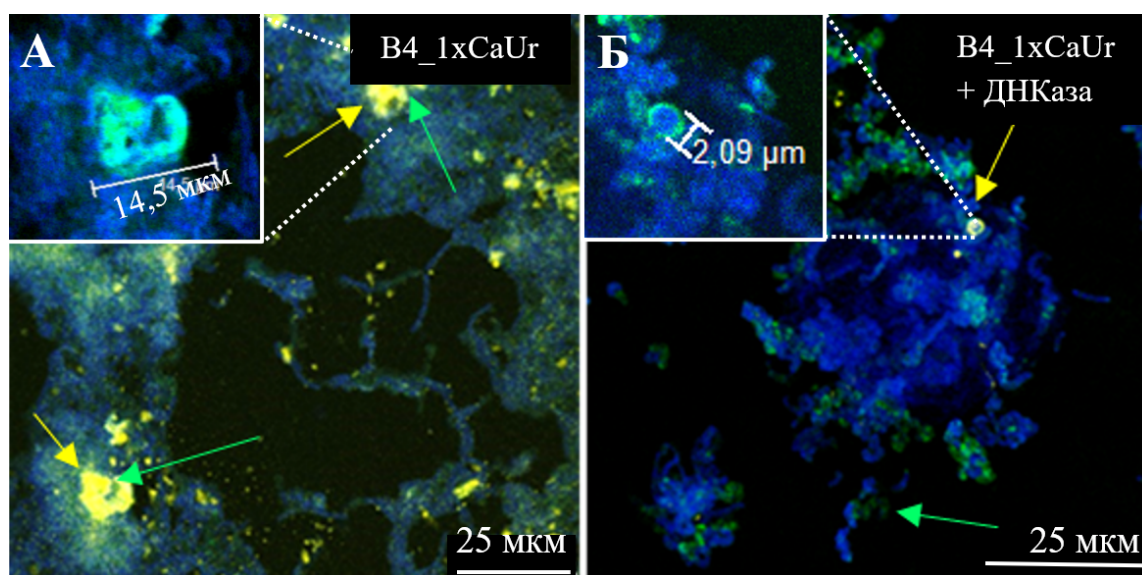


Рисунок 6 — Изображения конфокальной микроскопии образцов *B. cereus* 4В, полученных в среде B4_1xCaUr (А) и среде B4_1xCaUr + ДНКазы I (Б) с окрашиванием sytox green и бромфеноловым синим

При добавлении ДНКазы I в культуральную среду B4_1xCaUr в течение 33 часов, количество осажденных к 44 часу минералов CaCO_3 сокращалось приблизительно в 6 раз в сравнении с контрольной средой. По данным РЭМ, характерные размеры агломератов, образующихся в среде с вДНК (рис. 7А) и с удалением вДНК с помощью ДНКазы I (рис. 7Б), схожи и составляют около 100–250 мкм к 44 ч, при этом поверхность агломератов, образующихся с добавлением ДНКазы I, гораздо менее упорядочена и аморфна (рисунок 7Б, вставка), чем в образце, где не удалялся компонент ДНК (рисунок 7А, вставка).

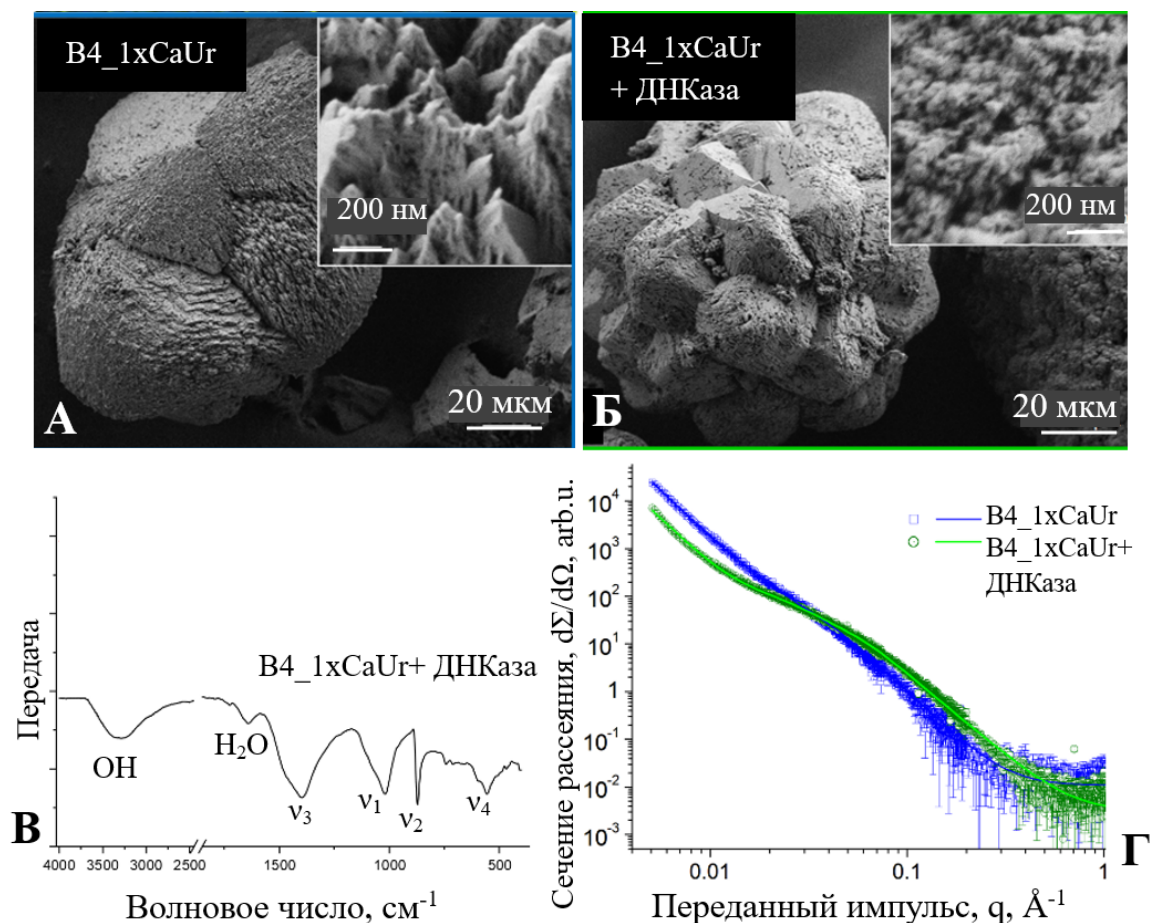


Рисунок 7 — А и Б: РЭМ-изображения морфологии осадков CaCO_3 , полученных при культивировании *B. cereus* 4В в среде B4_1xCaUr и B4_1xCaUr + ДНКазы — соответственно; В: ИК-спектр осадка, полученного в процессе БМ *B. cereus* 4В в среде с добавлением ДНКазы I; Г: Данные МУРР осадков, полученных в среде с ДНКазой I (зеленый) и без ДНКазы I (синий) в течение 44 ч

Данные ИК-спектроскопии свидетельствуют (рис. 7В), что при образовании CaCO_3 в отсутствие ДНК полиморфизм осадка сильно отличался от полученного в контрольном образце и содержал много примесей АКК, воды и ватерита. Данные МУРР (рисунок 7Г, зеленая кривая) также свидетельствуют о том, что удаление ДНК оказало значительное влияние на фрактальную размерность и верхний предел размера фрактальных структур в осадках, 2,58 и 6,3 нм соответственно.

Происхождение (размер) добавленной ДНК также оказал влияние и на мезомасштабную структуру осадка, полученного в бесклеточной среде: добавление плазмидной ДНК в среде с высокой концентрацией кальция привело к значительному снижению фрактальной размерности до 2,4 при менее существенном увеличении их размеров по сравнению с осадком, образованным в отсутствие ДНК и осадка, образованного в присутствии геномной ДНК (ДНК спермы лосося).

В настоящем исследовании продемонстрировано, что внеклеточная ДНК, входящая в состав ВКМ, ко-локализована с АКК на ранних этапах культивирования *B. cereus* 4В и включается в агрегаты осадков кристаллизованного CaCO_3 на более поздних стадиях. Ферментативная обработка ВКМ ДНКазой I останавливает биоминерализацию в планктонной культуре *B. cereus* 4В. Эволюция полиморфных превращений осадка CaCO_3 в процессе биоминерализации следует по пути «АКК → ватерит → кальцит», при этом происходит значительное увеличение размеров фрактальных кластеров, уплотнение их структуры, а также увеличение среднего размера осадков. Влияние ДНК на кристаллическую и мезомасштабную структуру CaCO_3 существенно в бактериальной системе, но отсутствует в бесклеточной. Схема течения бактериальной БМ, индуцированной *B. cereus* 4В представлена на рисунке 8.

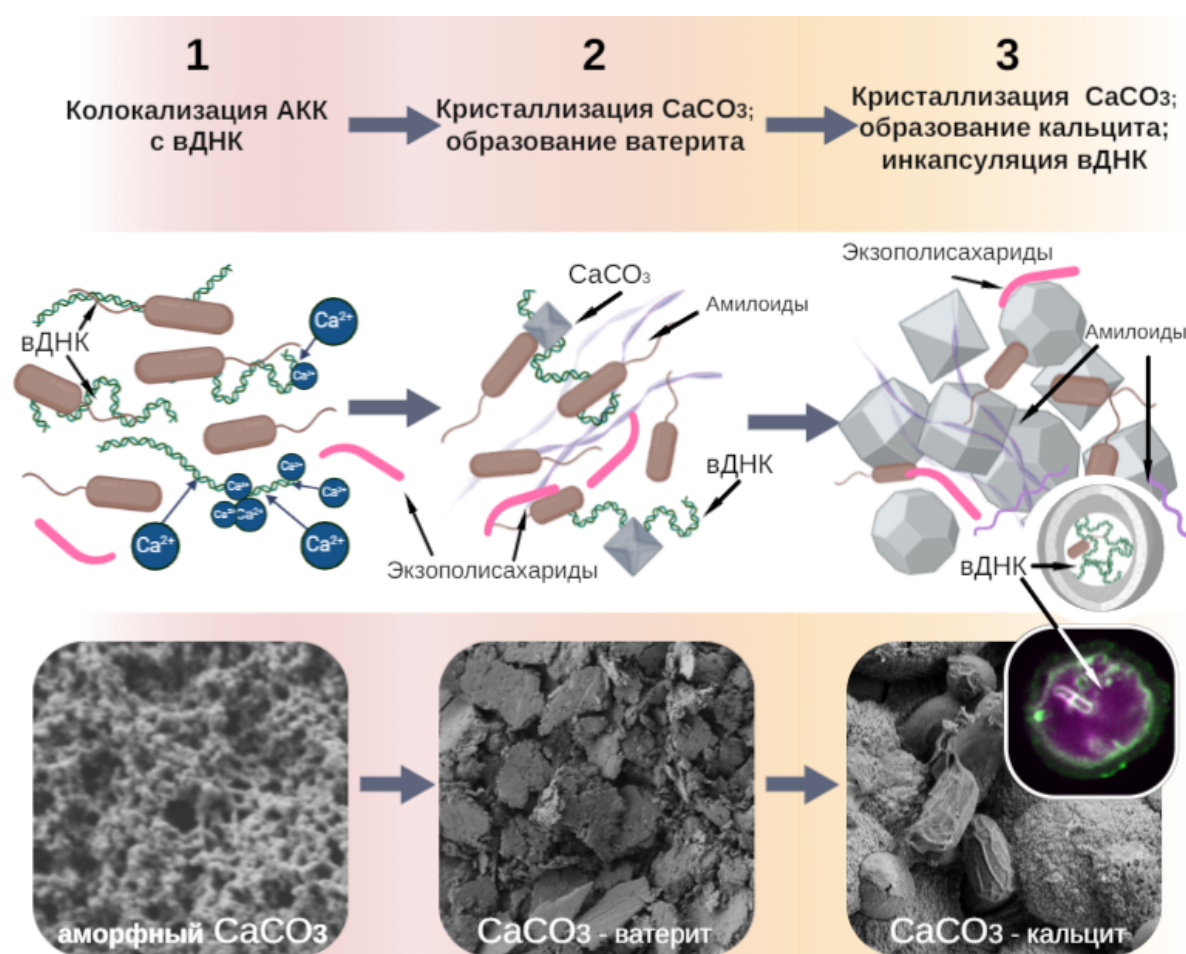


Рисунок 8— Схема течения процессов бактериальной БМ и образования ВКМ планктонной культуры *B. cereus* 4В

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были получены важные результаты, которые раскрывают роль компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) *Bacillus cereus* 4В в процессе биоминерализации (БМ). Установлено, что *B. cereus* 4В образует внеклеточный матрикс, включающий биополимеры: внеклеточную ДНК (вДНК), полисахариды и белки, в том числе амилоидные. Эти компоненты выполняют различные функции: экзополисахариды участвуют в хелатировании ионов и служат точками амилоидизации белков; вДНК хелатирует ионы кальция и, при увеличении pH и накоплении карбонат-анионов, способствует осаждению CaCO_3 , оставаясь при этом заключённой внутри агрегатов кристаллизующихся минералов; амилоидные белки покрывают биогенные минералы, образуя крупные агрегаты.

Исследование влияния компонентов среды, таких как мочевины и кальций, показало, что высокие концентрации ионов Ca^{2+} вызывают клеточный стресс, что приводит к усиленному выделению экзополисахаридов. Внеклеточная ДНК была обнаружена в больших количествах при одновременном присутствии кальция и мочевины, а осаждение CaCO_3 происходило только при наличии обоих этих компонентов. Количество белковой компоненты также зависело от концентрации кальция в среде.

Ключевая роль вДНК в процессе осаждения CaCO_3 была подтверждена экспериментально: фрагментация ДНК с помощью фермента ДНКазы I значительно снижает массовый выход осадка, в то время как добавление экзогенной ДНК или разрушенных клеток ускоряет осаждение CaCO_3 в бесклеточной системе.

В ходе исследования была прослежена эволюция кристаллической и надмолекулярной структуры осадённого CaCO_3 . Биогенные минералы с аморфным кальциевым карбонатом (АКК) в форме фрактальных агрегатов были обнаружены уже через 24 часа роста бактерий на среде, богатой кальцием и мочевиной. Трансформация полиморфов CaCO_3 происходила по пути «АКК → ватерит → кальцит» в течение 14 суток, что сопровождалось увеличением размеров фрактальных кластеров и уплотнением их структуры.

Сравнение осаждения CaCO_3 в бесклеточной системе и в бактериальной среде выявило существенные различия: в бесклеточной системе кристаллизация кальцита приходила к завершению в течение 2 часов после образования АКК, при этом стабилизации промежуточных полиморфов мы не наблюдали. Концентрация кальция существенно влияла на мезомасштабную структуру осадка: при десятикратном увеличении концентрации фрактальная размерность осадка возрастала с 2,5 до 2,8, а радиусы гирации крупномасштабных рассеивателей уменьшались с 46 нм до 40 нм.

Фрагментация ДНК-компоненты ВКМ с помощью ДНКазы I существенно влияла на надмолекулярную и кристаллическую структуру осадённого CaCO_3 . Осадок, полученный после

обработки, содержал больше воды, АКК и ватерита, обладал меньшей фрактальной размерностью (2,58) и меньшим верхним пределом размеров фрактальных структур (6,3 нм). В бесклеточной системе присутствие геномной ДНК оказывало менее выраженный эффект, увеличивая фрактальную размерность до 2,8 и уменьшая радиус гирации с 41 до 35 нм, тогда как добавление плазмидной ДНК приводило к снижению фрактальной размерности до 2,4.

В настоящем исследовании продемонстрировано, что внеклеточная ДНК, входящая в состав ВКМ, ко-локализована с АКК на ранних этапах культивирования *B. cereus* 4В и включается в агрегаты осадков кристаллизованного CaCO_3 на более поздних стадиях. Ферментативная обработка ВКМ ДНКазой I останавливает биоминерализацию в планктонной культуре *B. cereus* 4В. Эволюция полиморфных превращений осадка CaCO_3 в процессе биоминерализации следует по пути «АКК → ватерит → кальцит», при этом происходит значительное увеличение размеров фрактальных кластеров, уплотнение их структуры, а также увеличение среднего размера осадков. Влияние ДНК на кристаллическую и мезомасштабную структуру CaCO_3 существенно в бактериальной системе, но отсутствует в бесклеточной.

Таким образом, ДНК-компонента ВКМ играет триггерную роль в процессе биоминерализации у *B. cereus* 4В. По нашим предположениям, механизмы осаждения CaCO_3 , выявленные в исследовании, могут быть универсальными для большинства уреолитических бактерий, однако необходимо дальнейшее изучение биоминерализационных процессов у других штаммов, способных к индукции осаждения карбонатов. Для создания целостной картины биоминерализации нужны дальнейшие детальные исследования на генетическом и протеомном уровнях. Полученные результаты вносят вклад в понимание роли микроорганизмов в сложных процессах биоминерализации и открывают новые перспективы для применения инновационных технологий в медицине, экологии и строительстве.

В результате работы были сделаны следующие **выводы**:

1. В процессе биоминерализации планктонной культуры *Bacillus cereus* 4В основные компоненты внеклеточного матрикса (вДНК, полисахариды и белки, в том числе, амилоидные) выполняют следующие функции: экзополисахариды служат точками амилоидизации белков; вДНК хелатирует катионы Ca^{2+} и индуцирует осаждение CaCO_3 ; амилоидные белки способствуют агрегации биогенных минералов.
2. Биогенное осаждение карбоната кальция происходит только в присутствии кальция и мочевины, при этом высокая концентрация Ca^{2+} вызывает клеточный стресс.
3. Эволюция кристаллической и надмолекулярной структуры CaCO_3 сопровождается значительным увеличением характерных размеров фрактальных кластеров, а также

уплотнением их структуры. Трансформация полиморфов биогенного CaCO_3 происходит по пути «аморфный карбонат кальция → ватерит → кальцит».

4. Кристаллическая и надмолекулярная структура CaCO_3 в бесклеточной системе существенно отличается от структуры биогенных минералов, полученных в клеточной системе, и радикально зависит от концентрации ионов кальция.
5. Внеклеточная ДНК играет ключевую роль в индукции осаждения CaCO_3 планктонной культурой *B. cereus* 4В: фрагментация ДНК-компоненты внеклеточного матрикса уменьшает массовый выход осадка, а добавление экзогенной ДНК или разрушенных клеток ускоряет осаждение CaCO_3 . Добавление ДНК различного происхождения оказывает влияние на кристаллическую и мезомасштабную структуру CaCO_3 .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Ivanova L.A.**, Golovkina D.A., Zhurishkina E.V., Gorshkova Y. E., Yaprntsev A.D., Baranchikov A.E., Tsvigun N.V., Kopitsa G.P., Kulminskaya A.A. and Lebedev D.V. Structure Evolution of CaCO_3 Precipitates Formed during the *Bacillus cereus* Induced Biomineralization. *Minerals* 2023, 13(6), 740. 10.3390/min13060740.
2. **Ivanova L.A.**, Egorov V.V., Zabrodskaya Y.A., Shaldzhyan A.A., Baranchikov A. Ye., Tsvigun N.V., Lykholay A.N., Yaprntsev A.D., Lebedev D.V. & Kulminskaya A.A. Matrix is everywhere: extracellular DNA is a link between biofilm and mineralization in *Bacillus cereus* planktonic lifestyle. *npj Biofilms Microbiomes* 9, 9 (2023). 10.1038/s41522-023-00377-5.
3. Golovkina D.A., Zhurishkina E.V., **Ivanova L.A.**, Baranchikov A.E., Sokolov A.Y., Bobrov K.S., Masharsky A.E., Tsvigun N.V., Kopitsa G.P., Kulminskaya A.A. Calcifying bacteria flexibility in induction of CaCO_3 mineralization. *Life (Basel)*. 2020 Nov 28;10(12):317. doi: 10.3390/life10120317.

Тезисы

1. Иванова Л.А., Копица Г.П., Япрынцеv А.Д., Баранчиков А.Е., Лебедев Д.В., Кульминская А.А. Пути формирования кристаллической и надмолекулярной структуры биоминералов CaCO_3 , осажденных *B. cereus*. // Сб. мат. Курчатовского форума синхротронных и нейтронных исследований (Курчатov ФСНЭ 2024). – Москва, 2024. – С. 118.
2. Кульминская А.А., Иванова Л.А., Копица Г.П., Япрынцеv А.Д., Баранчиков А.Е., Лебедев Д.В. Биоминерализация CaCO_3 : о роли внеклеточных компонентов бактериальной биопленки // Сб. мат. конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем»: 16-я международная научная конференция. – Минск, 2024. – С. 132.

3. Иванова Л.А., Копица Г.П., Япрынцеv А.Д., Баранчиков А.Е., Лебедев Д.В., Кульминская А.А. Биоминерализация CaCO_3 : эволюция структуры осадков и зависимость их структурных параметров от состава бактериального матрикса // Сб. мат. конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем»: 16-я международная научная конференция. – Минск, 2024. – С. 121.
4. Иванова Л.А., Япрынцеv А.Д., Баранчиков А.Е., Егоров В.В., Забродская Я.А., Лебедев Д.В., Горшкова Ю.Е., Копица Г.П., Кульминская А.А. Внеклеточная ДНК – триггер бактериальной биоминерализации, индуцированной планктонной культурой *B. cereus* // Сб. мат. конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление»: 77-я Всероссийская школа-конференция молодых ученых. – Нижний Новгород, 2024. – С. 148.
5. Иванова Л.А., Головкина Д.А., Журишкина Е.В., Горшкова Ю.Е., Баранчиков А.Е., Япрынцеv А.Д., Цвигун Н.В., Копица Г.П., Кульминская А.А., Лебедев Д.В. Структурная эволюция карбоната кальция, осажденного в процессе бактериальной биоминерализации, индуцированной планктонной культурой *Bacillus cereus* // Сб. мат. конференции по использованию рассеяния нейтронов в исследовании конденсированных сред (РНИКС-2023). – Екатеринбург, 2023. – С. 250.
6. Иванова Л.А., Головкина Д.А., Журишкина Е.В., Горшкова Ю.Е., Копица Г.П., Кульминская А.А., Лебедев Д.В. Эволюция структуры осадков CaCO_3 , образующихся в процессе биоминерализации, индуцированной *Bacillus cereus* // Сб. мат. VI научной конференции по малоугловому рассеянию и рефлектометрии "МУРомец-2023". – Гатчина, 2023. – С. 18.
7. Иванова Л.А., Япрынцеv А.Д., Баранчиков А.Е., Цвигун Н.В., Забродская Я.А., Егоров В.В., Лебедев Д.В., Кульминская А.А. Участие макромолекулярных компонент внеклеточного бактериального матрикса в процессе биоминерализации // Сб. мат. VI Международной конференции VII Съезда биохимиков России. – Сочи, 2022. – Т. III. – С. 45.
8. Ivanova L.A., Zhurishkina E.V., Golovkina D.A., Baranchikov A.E., Yapryntsev A.D., Gorshkova Yu.E., Kopitsa G.P., Tsvigun N.V., Egorov V.V., Lebedev D.V., Kulminskaya A.A. Evolution of the structure of calcium carbonate precipitates formed in the process of biomineralization // International conference Condensed Matter Research at the IBR-2. – Dubna, 2022. – P. 63.
9. Tsvigun N.V., Golovkina D.A., Zhurishkina E.V., Yapryntsev A.D., Sokolov A.E., Kulminskaya A.A., Ivanova L.A., Baranchikov A.E., Gorshkova Yu.E., Volkov V.V., Kopitsa G.P. Mesostucture of calcium carbonate, obtained in the process of biomineralization // Condensed matter research at the IBR-2 International Conference. – Dubna, 2020. – P. 144.