

Научная статья
УДК 579.2; 543.42:57
DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-406-416>



Применение сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии для экспресс-оценки морфологии и химического состава бактериальных пленок при периодическом культивировании

Джигангир Асхатович Файзуллин*, Алексей Витальевич Кобелев**, Святослав Владимирович Клементьев**, Александр Семенович Сироткин**, Алексей Михайлович Рогов***, Вадим Владимирович Сальников*, Ольга Николаевна Макшакова*, Юрий Федорович Зуев*

*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Российская Федерация

**Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Российская Федерация

***Казанский федеральный университет, г. Казань, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Кобелев Алексей Витальевич, alexei-ksu@mail.ru

Аннотация. Основной формой существования бактерий в природе являются биопленки – прикрепленные к субстрату ассоциации клеток, окруженные полимерным матриксом. Изучение образования и функционирования биопленок имеет фундаментальное значение для управления процессами формирования микробных ассоциатов в экологии, биотехнологии и медицине. Поставленная цель требует разработки аналитических подходов, позволяющих при сохранении интактной структуры биопленок получать оперативную информацию на протяжении всего цикла жизнедеятельности микробного сообщества. В задачу работы входила адаптация методов сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии в качестве экспресс-метода анализа микробных биопленок. Для этого проведено сопоставительное изучение кинетики роста культуры бактерий *Bacillus subtilis* в течение 24 ч культивирования на твердом субстрате методами классической микробиологии и биохимии, электронной сканирующей микроскопии и Фурье ИК-спектроскопии. Установлено, что морфология биопленки меняется от равномерного заселения поверхности носителя планктонными клетками на начальной стадии роста (6 ч) до накопления внеклеточного матрикса и образования микроколоний в экспоненциальной и стационарной фазе (12–18 ч) и постепенного истощения матрикса в фазе отмирания клеток (24 ч). Результаты ИК-спектроскопии коррелируют с результатами биохимических исследований, что, в свою очередь, позволяет проводить оперативную оценку накопления белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот и получать информацию об их структурном состоянии в биопленке. По итогам исследования можно заключить, что сканирующая электронная микроскопия и Фурье ИК-спектроскопия в предложенном варианте применения позволяют получать взаимодополняющую информацию о морфологии и химическом составе микробных биопленок в процессе культивирования.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, микробные биопленки, Фурье ИК-спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллективному спектро-аналитическому Центру физико-химических исследований строения, свойств и состава веществ и материалов (ЦКП-САЦ) ФИЦ «Казанский научный центр РАН» за возможность проведения экспериментальных исследований, а также Казанскому (Приволжскому) федеральному университету за электронную микроскопию образцов в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия».

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Казанского научного центра РАН № 122011800137-0.

Для цитирования: Файзуллин Д. А., Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С., Рогов А. М., Сальников В. В., Макшакова О. Н., Зуев Ю. Ф. Применение сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии для экспресс-оценки морфологии и химического состава бактериальных пленок при периодическом культивировании // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 406–416. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-406-416>.

© Файзуллин Д. А., Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С., Рогов А. М., Сальников В. В., Макшакова О. Н., Зуев Ю. Ф., 2022

Application of scanning electron microscopy and IR spectroscopy for a timely evaluation of the morphology and chemical composition of bacterial films during batch cultivation

Djigangir A. Faizullin*, Aleksei V. Kobelev**, Svyatoslav V. Klement'ev**, Alexander S. Sirotkin**, Aleksei M. Rogov***, Vadim V. Salnikov*, Olga N. Makshakova*, Yurii F. Zuev*

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics FRC KazSC RAS, Kazan, Russian Federation

**Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

***Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation

Corresponding author: Aleksei V. Kobelev, alexei-ksu@mail.ru

Abstract. Bacteria most commonly exist in nature in the form of bacterial biofilms, i.e. associations of cells attached to a substrate surrounded by a polymer matrix. Research into biofilm formation and functioning is fundamental to the management of microbial associations in ecology, biotechnology and medicine. This task requires the development of analytical approaches capable of providing timely information throughout the life cycle of microbial communities at the same time as maintaining their intact structure. In this paper, we apply scanning electron microscopy and IR spectroscopy as rapid methods for analysing microbial biofilms. To this end, the growth kinetics of a *Bacillus subtilis* culture cultivated on a solid substrate for 24 h was comparatively studied by the methods of classical microbiology and biochemistry, electron scanning microscopy and Fourier-transform IR spectroscopy. The biofilm morphology was found to vary from a uniform settlement of planktonic cells over the substrate surface at the initial stage of growth (6 h) followed by the accumulation of the extracellular matrix and the formation of microcolonies at the exponential and stationary stage (12–18 h) and a gradual depletion of the matrix at the stage of cell death (24 h). The results of IR spectroscopy were established to agree well with those of biochemical studies, thereby demonstrating the potential of the method for a timely evaluation of the accumulation of proteins, polysaccharides and nucleic acids and for obtaining information about their structural state in the studied biofilm. It is concluded that scanning electron microscopy and Fourier-transform IR spectroscopy can be used for obtaining complementary information about the morphology and chemical composition of microbial biofilms during their cultivation.

Keywords: *Bacillus subtilis*, microbial biofilms, Fourier-transform IR spectroscopy, scanning electron microscopy

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the collective Spectro-Analytical Center for Physical and Chemical Studies of the Structure, Properties, and Composition of Substances and Materials (CKP-SAC) of the Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" for the opportunity to conduct experimental studies. The authors thank the Kazan (Volga Region) Federal University for the electron microscopy of samples at the Interdisciplinary Center "Analytical Microscopy".

Funding. The work was carried out within the framework of the government assignment 122011800137-0 for Federal Research Center Kazan Scientific Center of RAS.

For citation: Faizullin D. A., Kobelev A. V., Klement'ev S. V., Sirotkin A. S., Rogov A. M., Salnikov V. V., Makshakova O. N., Zuev Yu. F. Application of scanning electron microscopy and IR spectroscopy for a timely evaluation of the morphology and chemical composition of bacterial films during batch cultivation. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):406-416. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-406-416>.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в большинстве случаев в медицинской и биотехнологической практике активность микробных сообществ обусловлена образованием и функционированием микробных биопленок, представляющих собой полимерный матрикс с

иммобилизованными клетками, потребляющих питательные вещества и выделяющих во внешнюю среду продукты метаболизма и сигнальные молекулы¹. Для понимания этих процессов требуются методы изучения, позволяющие сохранить интактную структуру биопленок и получать оперативную

¹Марданова А. М., Кабанов Д. А., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. Биопленки: основные методы исследования: учеб.-метод. пос. Казань: К(П)ФУ, 2016. 42 с.

информацию на протяжении всего цикла жизнедеятельности микробного сообщества.

«Золотым стандартом» для исследования морфологии биопленок считается метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [1]. Однако он является дорогостоящим, требует длительной и квалифицированной подготовки образцов, в ходе которой биопленки теряют жизнеспособность, а их дальнейшее использование для анализа или рекультивации становится невозможным.

Использование классических методов микробиологии и биохимии для анализа химического состава связано с разрушением биопленок, выделением и раздельным анализом их компонентов. Таким образом, несмотря на то, что эти методы характеризуются высокой точностью и селективностью, они являются трудоемкими и недостаточными для характеристики динамики развития микробного сообщества. Совершенствование и применение спектроскопических методов позволяет в значительной степени решить задачу неdestructивного анализа сложных объектов, к каковым относятся биопленки.

Метод инфракрасной спектроскопии успешно применяется для характеристики вегетативных клеток микроорганизмов, спор бактерий, а также биопленок [2–4]. Установлено [2, 4], что разные виды микроорганизмов характеризуются индивидуальными ИК-спектрами, что обусловлено уникальным для каждого вида набором макромолекул (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот). Показано, что с помощью ИК-спектроскопии можно дифференцировать штаммы одного рода бактерий с высокой точностью (до 97%) [5] и получать информацию о химической структуре определенных компонентов бактерий – клеточных стенок, цитоплазматического вещества, пептидогликана, тейхоевых кислот, ДНК [6–8]. Исследования бактериальных культур с равным успехом могут проводиться в виде водных суспензий или сухих порошков. Исследование биопленок затрудняется тем, что биопленки формируются на поверхности субстратов, которые могут иметь собственное поглощение в ИК-диапазоне. В ряде работ перед снятием спектров зрелые биопленки отделяли от субстрата [9]. Однако этот способ неприемлем для изучения биопленок на ранних стадиях роста из-за их низкой механической прочности. Выращивание и исследование биопленок *in situ* на поверхности элемента нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) [10] позволяет устранить это ограничение, однако это технически сложно осуществимо из-за необходимости длительного времени поддерживать температуру и условия стерильности в измерительном отсеке спектрометра.

Выращивание биопленок *ex situ* на подложках из оптически прозрачного материала в ИК-диапазоне [11] представляется с практической точки зрения наиболее приемлемым, хотя требование прозрачности и биологической инертности ограничивает выбор подложек по химическому составу.

Регистрация спектров биопленок на просвет имеет преимущество перед методом НПВО также в том, что основной вклад в интенсивность спектра дает вещество в объеме биопленки, а не с ее поверхности, на которой могут адсорбироваться элементы питательной среды.

Настоящее исследование посвящено сопоставительному изучению кинетики роста модельной микробной культуры *Bacillus subtilis* на твердом субстрате с использованием комплекса методов классической микробиологии и биохимии, СЭМ и ИК-Фурье спектроскопии с целью оценки релевантности применения методов ИК-спектроскопии и СЭМ для получения оперативной информации о структуре и химическом составе биопленки на разных стадиях роста.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовалась культура *Bacillus subtilis* [12], полученная из лекарственного препарата «Споробактерин» (ООО «Бакорен», г. Оренбург, Россия).

Культивирование бактерий и получение образцов биопленок. Периодическое культивирование бактерий *B. subtilis* проводили в конических колбах на 250 мл на перемешивающем устройстве Incubator ES-20/60 (SIA Biosan, Латвия) при температуре 37 °С, скорости перемешивания 120 об/мин в течение 36 ч с отбором проб через каждые 6 ч. В качестве питательных сред использовался мясopептонный бульон (МПБ) и МПБ с красителем Конго красным (0,8 г/л), стерилизация которых проводилась в автоклаве в течение 30 мин при 0,5 ати².

Биопленки выращивали на подложках из фтористого кальция или предметных стеклах путем внесения в чашки Петри со стерильной средой и подложками 18-часового инокулята в соотношении 1:45 и последующей инкубации в течение 24 ч с отбором проб через каждые 6 ч.

Анализ формирования и микроструктуры биопленок. Отбор проб биопленки для анализа бактериального роста осуществляли в процессе культивирования *B. subtilis* вплоть до 36 ч. Число клеток *B. subtilis* в биопленке определяли путем их окрашивания генцианвиолетом [13, 14]. По полученным данным строили кривую роста. Количество жизнеспособных клеток определяли методом Коха.

Количество белка в биопленке *B. subtilis* определяли по методу Брэдфорда³. Предварительно биопленку, сформированную на поверхности предметных стекол, гидролизовали с помощью 2н NaOH в термоблоке при 90 °С в течение 30 мин. В полученных растворах определяли содержание белка.

Для оценки биосинтеза экзополисахаридов в биопленке *B. subtilis* исследуемые образцы, выращенные на МПБ с красителем Конго красным, отмывали в физиологическом растворе, проводили экстракцию красителя 96%-м раствором этанола и измеряли оптическую плотность экстракта [14, 15].

²Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.

Для проведения анализа ИК-спектроскопией биопленки выращивали по методу, описанному выше, используя в качестве подложек пластины из CaF_2 . В отличие от традиционного способа подготовки образцов биопленок для регистрации ИК-спектров, состоящего в соскабливании пленки с подложки, измельчении и запрессовке в матрицу из KBr [16], в данном исследовании использовались интактные биопленки. Для этого пластины на разных стадиях роста биопленки извлекали из питательной среды и высушивали при комнатной температуре и влажности. Биопленки не промывали, чтобы не нарушить их структуру. Пластины помещали в кюветный отсек Фурье ИК-спектрофотометра IR-Affinity 1 (Shimadzu, Япония) и регистрировали спектры на просвет в интервале волновых чисел $4000\text{--}900\text{ см}^{-1}$ при спектральном разрешении 4 см^{-1} с усреднением 64 индивидуальных сканов. Спектрометр продували сухим азотом для устранения мешающего влияния паров воды и углекислого газа. Для каждого образца регистрировали спектры с нескольких участков поверхности, которые затем усредняли.

ИК-спектры бактерий снимали аналогично, предварительно высушив водную суспензию клеток на поверхности пластины из CaF_2 .

Исходные спектры подвергали предварительной обработке, состоящей в вычитании базовой линии и сглаживании.

Для выделения отдельных компонентов многокомпонентных полос поглощения вычисляли вторую производную спектров. Отнесение полос проводили на основе данных работ [17–19].

Для исследования методом СЭМ биопленки выращивали на предметных стеклах. После извлечения из питательной среды подложки с биопленками высушивали и фиксировали в 2%-м глутаровом альдегиде на фосфатном буфере (pH 7,3) в течение 1 ч. После постфиксации в 1%-й осмиевой кислоте в течение 1 ч образцы промывали в буфере и дистиллированной воде и подвергали ступенчатой дегидратации в растворах спирта, после чего покрывали золотом [20]. Образцы исследовали на сканирующем электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия) Междисциплинарного центра аналитической микроскопии Казанского федерального университета.

Обработка результатов экспериментов проводилась с помощью пакета программ Microsoft Excel 2007 с оценкой достоверности по критерию Стьюдента–Фишера⁴. Использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Формирование биопленок в процессе микробного роста. На рис. 1 представлены микрофотографии поверхности субстрата после 6 и 24 ч роста

биопленки, полученные методом СЭМ. Изображения показывают, что по истечении 6 ч на поверхности субстрата (подложки) присутствуют преимущественно разрозненные палочкообразные образования без заметного количества матрикса (рис. 1, а). Размеры объектов соответствуют ожидаемым для бактерий *B. subtilis*: длина отдельных клеток варьируется от 0,7 до 3 мкм, диаметр составляет 0,5–0,6 мкм. Клетки образуют линейные цепочки, состоящие из 2 и более (до 10) звеньев, что указывает на их активное деление. Часто попадаются клетки, от которых отходят тяжи различной длины к субстрату или к другим клеткам (рис. 1, б). Через 24 ч роста обнаруживаются округлые плотные скопления клеток (рис. 1, с). Размеры скоплений варьируются от нескольких мкм до нескольких десятков мкм, а длина клеточных цепочек сокращается до 1–3 звеньев. На этом этапе роста отчетливо проявляется внеклеточный матрикс, заполняющий межклеточные промежутки в скоплениях в виде диффузного вещества (рис. 1, d).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что структура биопленки на всем протяжении роста не является однородной и состоит из дискретных клеточных ассоциатов переменного размера. Внутри ассоциатов клетки объединены веществом внеклеточного матрикса. Промежутки между ассоциатами заполняются либо питательной средой, либо матриксом.

Накопление белков и экзополисахаридов в биопленке. Результаты определения биомассы, накопления белка и экзополисахаридов в биопленке в процессе периодического культивирования культуры *B. subtilis* продемонстрированы на рис. 2–4.

На рис. 2 представлена кривая роста культуры *B. subtilis* в биопленке, полученная по результатам измерения оптической плотности раствора генцианвиолета, экстрагированного этанолом из биопленки: чем больше красителя первоначально было связано в биопленке, тем большее значение оптической плотности раствора было зарегистрировано в результате экстракции.

Полученные результаты показали, что число клеток в биопленке в первые 6 ч принципиально не увеличивается, что связано с первичной иммобилизацией небольшого количества клеток на поверхности и началом образования биопленки. Затем были отмечены фазы ускорения и экспоненциального роста биопленки (6–18 ч), после чего наступала стационарная фаза роста, когда дальнейшее накопление клеток прекращается вследствие истощения питательной среды и накопления продуктов метаболизма [13].

При этом было отмечено, что концентрация белка в биопленке возрастает до 12 ч роста, что связано с активным формированием биопленки на поверхности, после которого наступает фаза

³Общая фармакопейная статья. Определение белка. ОФС. 1.2.3.0012.15 МЗ РФ. 2015. 16 с.

[Электронный ресурс]. URL: <https://pharmacosropeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka> (24.02.2022).

⁴Воробьев В. Я., Елсуков А. И. Теория и эксперимент. Минск: Высшая школа, 1989. 109 с.

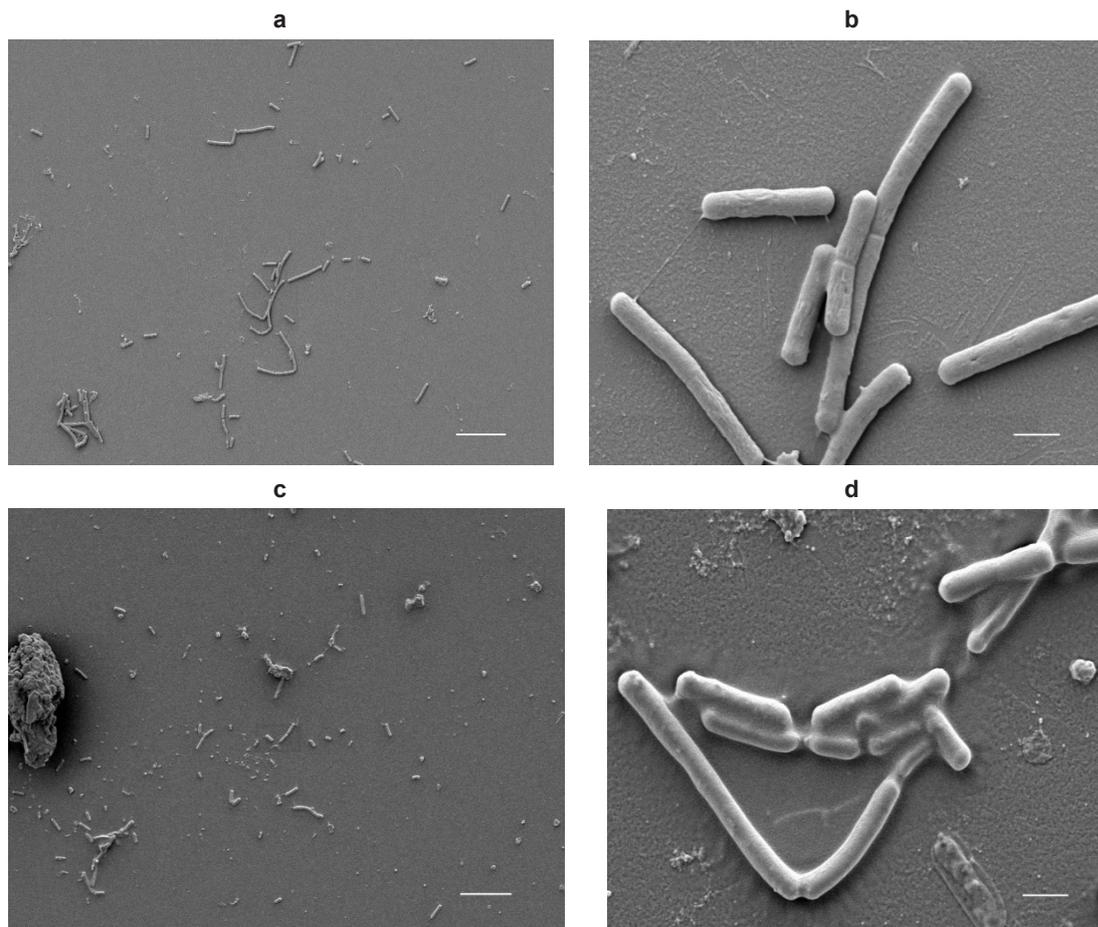


Рис. 1. Изображения сканирующей электронной микроскопии поверхности субстрата после 6 (а, b) и 24 ч (с, d) роста биопленки. Размер масштабного отрезка равен 10 (а, с) и 1 мкм (b, d)

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of the substrate surface after 6 (a, b) and 24 h (c, d) biofilm growth. The size of the scale bar is 10 (a, c) and 1 μm (b, d)

плато до 18 ч включительно (см. рис. 3). Дальнейшее увеличение концентрации белка в биопленке, по-видимому, связано с лизисом клеток.

Синтез экзополисахаридов (ЭПС) в биопленке *B. subtilis* (см. рис. 4) определяли по количеству экстрагируемого этанолом красителя Конго красного, связывающегося с ЭПС в процессе инкубации [21]. Результаты показали замедленный синтез ЭПС до 12 ч роста с дальнейшим резким увеличением на 18 ч и последующим выходом на плато. Полученные данные коррелируют с кривой

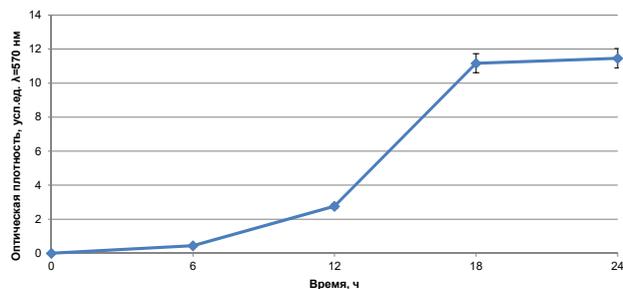


Рис. 2. Кинетика роста культуры *Bacillus subtilis* в биопленке в процессе периодического культивирования
Fig. 2. Growth kinetics of *Bacillus subtilis* culture in biofilm during batch cultivation

роста матрикса биопленки культуры (см. рис. 2). Эти сведения подтверждаются проведенными ранее исследованиями [22], которые показали, что синтез ЭПС и рост матрикса биопленки *B. subtilis* происходит симбатно (коэффициент корреляции $r=0,998$), что свидетельствует о том, что матрикс состоит из ЭПС.

ИК-спектроскопия образцов биопленки. ИК-спектры сухой суспензии и сухой биопленки (24 ч) *B. subtilis* выявляют различия в составе этих образцов. Прежде всего следует отметить разницу

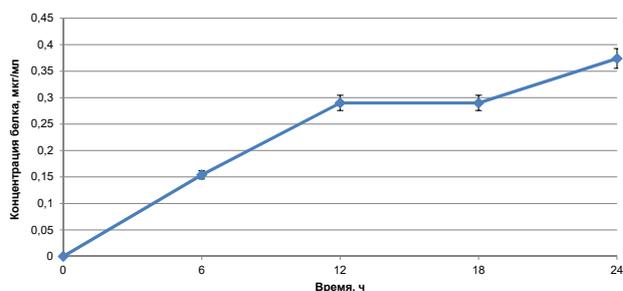


Рис. 3. Концентрация белка в биопленке *Bacillus subtilis* в процессе периодического культивирования
Fig. 3. Protein concentration in *Bacillus subtilis* biofilm during batch cultivation

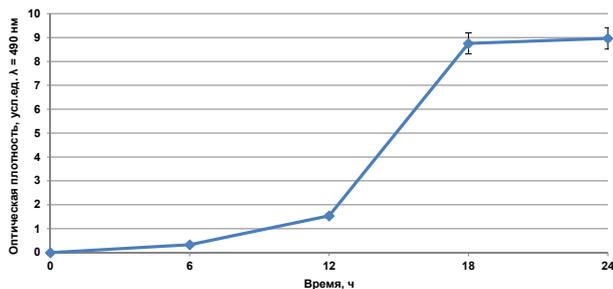


Рис. 4. Концентрация экзополисахаридов в биопленке *Bacillus subtilis* в процессе периодического культивирования

Fig. 4. Concentration of exopolysaccharides in *Bacillus subtilis* biofilm during batch cultivation

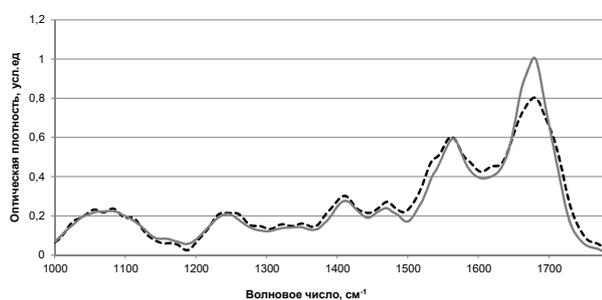


Рис. 5. ИК-спектры сухой суспензии клеток *Bacillus subtilis* (штрихи) и сухой биопленки после 24 ч инкубации (сплошная линия). Спектры нормированы к максимуму полосы поглощения амид II белка (1550 см⁻¹)

Fig. 5. IR spectra of *Bacillus subtilis* cells dry suspension (dashes) and dry biofilm after 24 h of incubation (solid line). The spectra are normalized to the maximum absorption band of the amide II protein (1550 cm⁻¹)

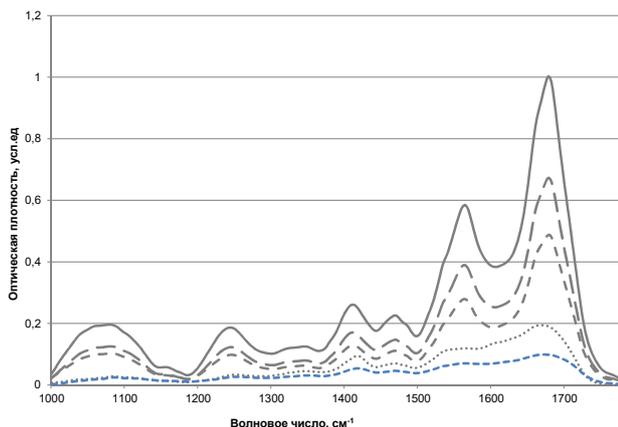


Рис. 6. ИК-спектры сухих биопленок *Bacillus subtilis* на разных стадиях роста: 6 (точки), 12 (пунктир), 18 (штрихи) и 24 (сплошная линия) ч. Нижняя пунктирная линия соответствует спектру питательной среды

Fig. 6. IR spectra of dry *Bacillus subtilis* biofilms at different growth stages: 6 (points), 12 (dotted line), 18 (dashed lines), and 24 (solid line) h. The blue dotted line indicate the nutrient medium spectrum

в форме амид-1 – наиболее интенсивной полосы в спектрах, обусловленной поглощением карбоновых групп в составе полипептидной цепи белков (рис. 5).

Более узкая и интенсивная полоса в спектре биопленки с максимумом на 1655 см⁻¹ и плечом на 1637 см⁻¹ указывает на присутствие высокоупорядоченных белков с большой долей альфа-спиралей и вытянутых бета-структур [17]. Известно, что в белково-полисахаридном матрице биопленки преобладает белок TasA [23], имеющий спиральную структуру, что соответствует наблюдаемому спектру. В спектре суспензии полоса амид-1 уширена и за счет этого менее интенсивна. Уширение свидетельствует о большой доле неупорядоченных структур. Интенсивности полос фосфатных групп ДНК (1240 и 1080 см⁻¹) и углеводов (1060 см⁻¹) в суспензии и пленке примерно равны, однако отличаются по форме, указывая на различия в составе.

На рис. 6 представлены спектры образцов биопленок на разных стадиях роста. Спектр образца после 6 ч роста в основном мало отличается от спектра питательной среды для образования биопленки. Изменения проявляются лишь в некоторых полосах – 1425, 1550, 1680 см⁻¹, что, по-видимому, соответствует вкладу белков. Спектр МПБ представляет собой широкие плохо разрешенные полосы, соответствующие суммарному поглощению различных аминокислот, коротких полипептидов и прочих компонент. Однако на более поздних сроках роста в спектре преобладают узкие полосы, соответствующие поглощению структурно упорядоченных белков. Резкое сокра-

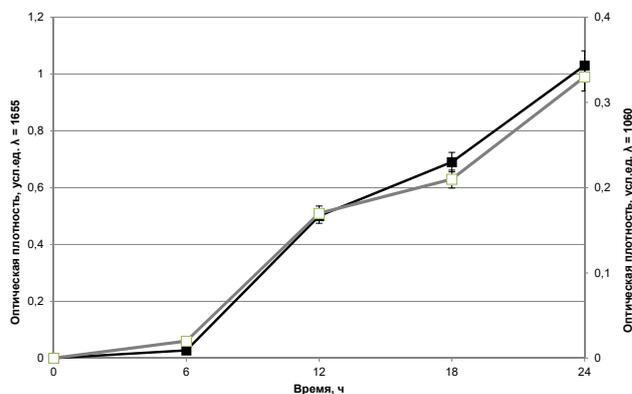


Рис. 7. Интенсивность в максимуме полосы амид I (1655 см⁻¹) белка (темные символы), интенсивность в максимуме 1060 см⁻¹ полосы поглощения полисахаридов (светлые символы) от времени роста биопленки. Точки, соответствующие 6 ч, получены вычитанием спектра мясопептонного бульона из спектра 6-часовой биопленки

Fig. 7. Intensity at the maximum of the amide I band (1655 cm⁻¹) of the protein (dark symbols), intensity at the maximum of 1060 cm⁻¹ of the absorption band of polysaccharides (light symbols) versus the biofilm growth time. The points corresponding to 6 h were obtained by subtracting the MPB spectrum from the 6 h biofilm spectrum

щение спектрального вклада питательной среды связано, по нашему мнению, с изменением гидрофобности поверхности. На ранних стадиях роста гидрофильная поверхность подложки с адсорбированными одиночными клетками хорошо удерживает воду с растворенными в ней элементами МПБ. После 12 ч бактериального роста образуется развитая бактериальная пленка с гидрофобной поверхностью [24], которая лучше освобождается от остатков культуральной жидкости в процессе подготовки образцов.

Зависимость интенсивности поглощения белка на 1655 см⁻¹ и суммарной полосы фосфатных групп и полисахаридов на 1060 см⁻¹ от времени роста представлена на рис. 7. На зависимости можно выделить характерные участки роста биопленки: лаг-период до 6 ч, постоянная скорость накопления – 6–24 ч. При сравнении зависимостей, полученных при определении концентрации белков и ЭПС (см. рис. 3, 4), а также из ИК-спектров (см. рис. 7), обнаруживается их близкое сходство ($r_{\text{белков}} = 0,913$; $r_{\text{эпс}} = 0,881$), что указывает на идентичность химической природы исследуемых веществ. Обращает на себя внимание тот факт, что суммарное поглощение белка и суммарное поглощение фосфатных групп ДНК и полисахаридов в спектре меняется симбатно ($r = 0,998$) (см. рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Результаты исследования химического состава и морфологии биопленок *B. subtilis* на разных стадиях роста комплексом спектральных, микробиологических и микроскопических методов согласуются с литературными данными [25, 26].

2. Показано, что увеличение биомассы в биопленке *B. subtilis* коррелирует с накоплением белка ($r = 0,795$) и ЭПС ($r = 0,998$), что отражает зависимость между биосинтезом необходимых метаболитов, ростом клеток и продукцией полимерного матрикса.

3. Результаты ИК-спектроскопии коррелируют ($r_{\text{белков}} = 0,913$; $r_{\text{эпс}} = 0,881$) с данными биохимических исследований и позволяют проводить оперативную оценку накопления белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот, а также дают информацию об их структурном состоянии в биопленке в процессе культивирования микробной культуры и образования биопленки.

4. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что СЭМ и Фурье ИК-спектроскопия в предложенном варианте применения дают возможность получать взаимодополняющую информацию о морфологии и химическом составе микробных биопленок в процессе культивирования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Abed S. E., Ibensouda S. K., Latrache H., Hamadi F. Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. IntechOpen, 2012. 830 p. <https://doi.org/10.5772/34990>.

2. Preisner O., Lopes J. A., Guiomar R., Machado J., Menezes J. C. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2007. Vol. 387, no. 5. P. 1739–1748. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0851-1>.

3. Уткин Д. В., Куклев В. Е., Ерохин П. С., Осина Н. А. Применение методов спектроскопии для индикации и идентификации патогенных биологических агентов // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. N 2. С. 68–71. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-2\(108\)-68-71](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-2(108)-68-71).

4. Рой А. А., Курдиш И. К., Остапюк С. Н., Савельев Ю. В. Влияние условий культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомициноустойчивого мутанта на свойства поверхности этих бактерий // Мікробіологічний журнал. 2017. Т. 79. N 4. С. 12–20.

5. Сунцова А. Ю., Гулиев Р. Р., Попов Д. А., Восстрикова Т. Ю., Дубоделов Д. В., Щеголихин А. Н. [и др.]. Идентификация микроорганизмов с помощью инфракрасных Фурье-спектров // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2018. N 4. С. 57–65. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.046>.

6. Rodriguez-Saona L. E., Khambaty F. M., Fry F. S., Dubois J., Calvey E. M. Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier

transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis // Journal of Food Protection. 2004. Vol. 67, no. 11. P. 2555–2559. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.11.2555>.

7. Rebuffo C. A., Schmitt J., Wenning M., von Stetten F., Scherer S. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy // Applied and Environmental Microbiology. 2006. Vol. 72, no. 2. P. 994–1000. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.994-1000.2006>.

8. Wenning M., Buchl N. R., Scherer S. Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks // Journal of Biophotonics. 2010. Vol. 3, no. 8-9. P. 493–505. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000015>.

9. Ma W., Peng D., Walker S. L., Cao B., Gao C.-H., Huang Q., et al. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides // NPJ. Biofilms and Microbiomes. 2017. Vol. 3. Article number: 4. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0013-6>.

10. Humbert F., Quilès F. In-situ study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex Research Center, 2011. P. 889–895.

11. Tugarova A. V., Scheludko A. V., Dyatlova Yu. A., Filip'echeva Yu. A., Kamnev A. A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 // Journal

of Molecular Structure. 2017. Vol. 1140. P. 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>.

12. Кобелев А. В., Клементьев С. В., Вдовина Т. В., Сироткин А. С. Оценка активности внеклеточных лектинов бактерий в формировании агрегированных микробных форм // Бутлеровские сообщения. 2021. Т. 65. N 1. С. 105–113. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/21-65-1-105>.

13. Merritt J. H., Kadouri D. E., O'Toole G. A. Growing and analyzing static biofilms // Current Protocols in Microbiology. 2005. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01>.

14. Хабибуллина А. Р., Вдовина Т. В., Кобелева И. В., Сироткин А. С. Исследование процесса биологической дефосфатации модельных сред с использованием фосфатаккумуляирующих бактерий // Вестник технологического университета. 2017. Т. 20. N 19. С. 131–133.

15. Годовалов А. П., Карпунина Т. И. Определение компонентного состава биопленок грамположительных бактерий // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. Т. 64. N 10. С. 632–634. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-632-634>.

16. Nayak N., Nag T. C., Satpathy G., Ray S. B. Ultrastructural analysis of slime positive & slime negative Staphylococcus epidermidis isolates in infectious keratitis // Indian Journal of Medical Research. 2007. Vol. 125, no. 6. P. 767–771.

17. Litvinov R. I., Faizullin D. A., Zuev Yu. F., Weisel J. W. The α -helix to β -sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots // Biophysical Journal. 2012. Vol. 103, no. 5. P. 1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.046>.

18. Wang H., Ding S., Wang G., Xu X., Zhou G. In situ characterization and analysis of Salmonella biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach // International Journal of Food Microbiology. 2013. Vol. 167, no. 3. P. 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>.

19. Gieroba B., Krysa M., Wojtowicz K., Wiater A., Pleszczyńska M., Tomczyk M., et al. The FT-IR and raman spectroscopies as tools for biofilm characterization created by cariogenic streptococci //

International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, no. 1. P. 3811. <https://doi.org/10.3390/ijms21113811>.

20. McCutcheon J., Southam G. Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation // Chemical Geology. 2018. Vol. 498. P. 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.016>.

21. Ярец Ю. И., Шевченко Н. И. Новый метод анализа бактериальной биопленки // Наука и инновации. 2016. N 10. С. 64–68.

22. Клементьев С. В., Кобелев А. В., Сироткина А. С. О формировании клеточных агрегатов под действием бактериальных лектинов // Пищевые технологии и биотехнологии: материалы XVII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная Году науки и технологий в Российской Федерации (г. Казань, 20–23 апреля 2021 г.). Казань: КНИТУ, 2021. С. 453–458.

23. Branda S. S., Chu F., Kearns D. B., Losick R., Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix // Molecular Microbiology. 2006. Vol. 59, no. 4. P. 1229–1238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x>.

24. Epstein A. K., Pokroy B., Seminara A., Aizenberg J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. Vol. 108, no. 3. P. 995–1000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011033108>.

25. Бисенова Г. Н., Торина А. К., Шегебаева А. А. Изучение динамики роста бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* при периодическом культивировании // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. 2014. Т. 82. N 3. С. 3–9.

26. Шарипова М. Р., Марданова А. М., Рудакова Н. Л., Пудова Д. С. Бистабильность и формирование матрикса биопленки как механизмы адаптации *Bacillus subtilis* в стационарной фазе // Микробиология. 2021. Т. 90. N 1. С. 24–42. <https://doi.org/10.31857/S0026365620060178>.

REFERENCES

1. Abed S. E., Ibsouda S. K., Latrache H., Hamadi F. Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. IntechOpen; 2012. 830 p. <https://doi.org/10.5772/34990>.

2. Preisner O., Lopes J. A., Guiomar R., Machado J., Menezes J. C. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;387(5):1739–1748. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0851-1>.

3. Utkin D. V., Kouklev V. E., Erokhin P. S., Ossina N. A. Application of spectroscopy methods for indication and identification of pathogenic biological agents. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2011;(2):68–71. (In Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011->

2(108)-68-71.

4. Roy A. A., Kurdish I. K., Ostapyuk S. N., Saveleyev Yu. V. Influence of the cultivation conditions of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and its streptomycin-resistant mutant on the surface properties of these bacteria. *Mikrobiologichnii zhurnal*. 2017;79(4):12–20. (In Russian). <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.04.012>.

5. Suntsova A. Yu., Guliev R. R., Popov D. A., Vostrikova T. Yu., Dubodelov D. V., Shchegolikhin A. N., et al. Identification of microorganisms by fourier-transform infrared spectroscopy. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*. 2018;(4):57–65. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.046>.

6. Rodriguez-Saona L. E., Khambaty F. M., Fry F. S.,

- Dubois J., Calvey E. M. Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Protection*. 2004;67(11):2555-2559. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.11.2555>.
7. Rebuffo C. A., Schmitt J., Wenning M., von Stetten F., Scherer S. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(2):994-1000. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.994-1000.2006>.
8. Wenning M., Buchl N. R., Scherer S. Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Journal of Biophotonics*. 2010;3(8-9):493-505. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000015>.
9. Ma W., Peng D., Walker S. L., Cao B., Gao C.-H., Huang Q., et al. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. *NPJ. Biofilms and Microbiomes*. 2017;3. Article number: 4. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0013-6>.
10. Humbert F., Quilès F. In-situ study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy. In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Bada-joz: Formatex Research Center; 2011, p. 889-895.
11. Tugarova A. V., Scheludko A. V., Dyatlova Yu. A., Filip'echeva Yu. A., Kamnev A. A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610. *Journal of Molecular Structure*. 2017;1140:142-147. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>.
12. Kobelev A. V., Klementyev S. V., Vdovina T. V., Sirotkin A. S. Evaluation of the activity of bacterial extracellular lectins in the formation of aggregated microbial forms. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2021;65(1):105-113. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/21-65-1-105>.
13. Merritt J. H., Kadouri D. E., O'Toole G. A. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*. 2005. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01>.
14. Chabibullina A. P., Vdovina T. V., Kobeleva J. V., Sirotkin A. S. Study of the process of biological dephosphatization of model media using phosphate-accumulating bacteria. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*. 2017;20(19):131-133. (In Russian).
15. Godovalov A. P., Karpunina T. I. The determination of biofilm composition of gram-positive bacteria. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019;64(10):632-634. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-632-634>.
16. Nayak N., Nag T. C., Satpathy G., Ray S. B. Ultrastructural analysis of slime positive & slime negative *Staphylococcus epidermidis* isolates in infectious keratitis. *Indian Journal of Medical Research*. 2007;125(6):767-771.
17. Litvinov R. I., Faizullin D. A., Zuev Yu. F., Weisel J. W. The α -helix to β -sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots. *Biophysical Journal*. 2012;103(5):1020-1027. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.046>.
18. Wang H., Ding S., Wang G., Xu X., Zhou G. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;167(3):293-302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>.
19. Gieroba B., Krysa M., Wojtowicz K., Wiater A., Pleszczyńska M., Tomczyk M., et al. The FT-IR and raman spectroscopies as tools for biofilm characterization created by cariogenic streptococci. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(1):3811. <https://doi.org/10.3390/ijms21113811>.
20. McCutcheon J., Southam G. Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation. *Chemical Geology*. 2018;498:115-127. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.016>.
21. Yarets Yu. I., Shauchenka N. I. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. *Nauka i innovatsii*. 2016;(10):64-68. (In Russian).
22. Klementev S. V., Kobelev A. V., Sirotkin A. S. About formation of cell aggregates under the action of bacterial lectins. In: *Pishchevyte tekhnologii i biotekhnologii: materialy XVII Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh, aspirantov i studentov s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennaya Godu nauki i tekhnologii v Rossiiskoi Federatsii = Food technologies and biotechnologies: materials of the XVII All-Russian Conference of Young Scientists, Postgraduates and Students with International Participation, dedicated to the Year of Science and Technology in the Russian Federation*. Kazan: Kazanskii natsional'nyi issledovatel'skii tekhnologicheskii universitet, 2021; p. 453-458. (In Russian).
23. Branda S. S., Chu F., Kearns D. B., Losick R., Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*. 2006;59(4):1229-1238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x>.
24. Epstein A. K., Pokroy B., Seminara A., Aizenberg J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;108(3):995-1000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011033108>.
25. Bisenova G. N., Torina A. K., Shegebaeva A. A. Study of the dynamics of growth of bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* during periodic cultivation. *Vestnik nauki Kazakhskogo agrotekhnicheskogo universiteta im. S. Seifullina = Herald of Science of S Seifullin Kazakh Agro Technical University*. 2014;82(3):3-9. (In Russian).
26. Sharipova M. R., Mardanova A. M., Rudakova N. L., Pudova D. S. Bistability and formation of the biofilm matrix as adaptive mechanisms during the stationary phase of *Bacillus Subtilis*. *Mikrobiologiya*. 2021;90(1):24-42. <https://doi.org/10.31857/S0026365620060178>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Д. А. Файзуллин,
старший научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ
КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2,
Российская Федерация,
dfaizullin@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2872-732>

Djigangir A. Faizullin,
Senior Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry
and Biophysics, Federal Research Center
KazSC RAS,
2, Lobachevsky St., 420111, Kazan,
Russian Federation,
dfaizullin@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2872-732X>

А. В. Кобелев,
ведущий инженер,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
alexei-ksu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9070-739X>

Aleksei V. Kobelev,
Lead Engineer,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
alexei-ksu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9070-739X>

С. В. Клементьев,
магистрант, техник 1 категории,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
slava_klementev3715@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

Svyatoslav V. Klement'ev,
Master's Student, Technician of the 1st category,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
slava_klementev3715@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

А. С. Сироткин,
д.т.н., профессор, заведующий кафедрой
промышленной биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

Alexander S. Sirotkin,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of Industrial Biotechnology Department,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

А. М. Рогов,
инженер,
Казанский федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,
Российская Федерация,
alexeyrogov111@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7086-4280>

Aleksei M. Rogov,
Engineer,
Kazan Federal University,
18, Kremlevskaya St., 420008, Kazan,
Russian Federation,
alexeyrogov111@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7086-4280>

В. В. Сальников,
заведующий лабораторией,
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ
КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2, Российская
Федерация,
vadim.salnikov.56@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

Vadim V. Salnikov,
Head of Laboratory,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Federal Research Center KazSC RAS,
2, Lobachevsky St., 420111, Kazan,
Russian Federation,
vadim.salnikov.56@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

О. Н. Макшакова,
старший научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ
КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2, Российская
Федерация,

Olga N. Makshakova,
Senior Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics
Federal Research Center KazSC RAS,
2, Lobachevsky St., 420111, Kazan,
Russian Federation,

omega12@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

Ю. Ф. Зуев,
руководитель лаборатории биофизической химии наносистем,
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2, Российская Федерация,
yufzuev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6715-2530>

Вклад авторов

Д. А. Файзуллин – проведение экспериментов по ИК-спектроскопии.
А. В. Кобелев, С. В. Клементьев – подготовка образцов биопленок, биохимический анализ биопленок.
А. М. Рогов, В. В. Сальников – подготовка образцов для СЭМ.
Д. А. Файзуллин, О. Н. Макшакова, А. В. Кобелев, А. С. Сироткин, Ю. Ф. Зуев – проведение общего анализа результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 11.07.2022.
Одобрена после рецензирования 05.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.

omega12@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

Yurii F. Zuev,
Head of the Laboratory of Biophysical Chemistry of Nanosystems,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center KazSC RAS,
2, Lobachevsky St., 420111, Kazan, Russian Federation,
yufzuev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6715-2530>

Contribution of the authors

D. A. Faizullin – IR spectroscopy.
A. V. Kobelev, S. V. Klementiev – biofilm samples preparation, biochemical analysis of biofilms.
A. M. Rogov, V. V. Salnikov – samples preparation for SEM.
D. A. Faizullin, O. N. Makshakova, A. V. Kobelev, A. S. Sirotkin, Yu. F. Zuev – general analysis of the results.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 11.07.2022.
Approved after reviewing 05.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.