УДК 579.088.5:537.63
DOI: 10.34215/1609-1175-2023-1-38-43

CC BY 4.0

Система для изучения механизмов флокуляции и автоагрегации бактерий, основанная на магнитной левитации

П.А. Домнин[1], А.Е. Захарченко[1], Д.Т. Реджепов[2], С.А. Ермолаева[1]

[1] Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;
[2] Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Цель работы – оценка применимости системы, основанной на магнитной левитации, для изучения автоагрегации грамотрицательных и грамположительных патогенных бактерий и выяснения механизмов, контролирующих автоагрегацию. **Материалы и методы.** В работе были использованы вирулентные штаммы *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*. Количество живых бактерий определяли с использованием дифференциального красителя Live/Dead®. Окраску курлей *E. coli* проводили красителем конго красный. **Результаты.** Все 4 протестированных вида бактерий в использованных нами условиях формировали автоагрегаты, которые левитировали в объеме жидкости в течение до 72 часов (время наблюдения). Количество живых бактерий в автоагрегатах через 72 часа составляло от 82 (*E. coli*) до 99% (*L. monocytogenes*). С использованием описанной системы было показано, что формирование автоагрегатов *E. coli* зависит от продукции курлей – поверхностных структур, играющих большую роль также и в формировании биопленок. **Заключение.** Предложена система магнитной левитации, позволяющая изучать молекулярные механизмы автоагрегации и флокуляции патогенных бактерий.

Ключевые слова: *автоагрегация, патогенные бактерии, магнитная левитация, курли*

Поступила в редакцию: 15.12.22. Получена после доработки: 19.12.22, 22.12.22, 25.12.22, 07.01.22. Принята к печати: 20.01.23

Для цитирования: Домнин П.А., Захарченко А.Е., Реджепов Д.Т., Ермолаева С.А. Система для изучения механизмов флокуляции и автоагрегации бактерий, основанная на магнитной левитации. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2023;1:38–43. doi: 10.34215/1609-1175-2023-1-38-43

Для корреспонденции: Ермолаева Светлана Александровна – д-р биол. наук, зав. лабораторией экологии возбудителей инфекций Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18); ORCID: 0000-0003-3396-6816; тел.: +7 (499) 193-43-75; e-mail: drermolaeva@mail.ru

A magnetic levitation-based system to study the mechanisms of bacterial flocculation and autoaggregation

P.A. Domnin[1], A.E. Zakharchenko[1], D.T. Rejepov[2], S.A. Ermolaeva[1]

[1] Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;
[2] People's Friendship University, Moscow, Russia

Objective. To evaluate the potential of magnetic levitation systems when studying the autoaggregation of gram-negative and gram-positive pathogenic bacteria and elucidating mechanisms controlling autoaggregation. **Materials and methods.** *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* were used. The number of alive bacteria was determined using a Live/Dead® dye. *E. coli* curli were stained with Congo red. **Results.** All four tested bacterial species formed autoaggregates that levitated within the liquid volume for up to 72 hours (observation time). After 72 hours, the number of alive bacteria in the autoaggregates ranged from 82% (*E. coli*) to 99% (*L. monocytogenes*). The formation of *E. coli* autoaggregates was shown to depend on the production of curli, which represent surface structures playing an important role in biofilm formation. **Conclusion.** The proposed system of magnetic levitation can be used to study molecular mechanisms of bacterial autoaggregation and flocculation.

Keywords: *autoaggregation, pathogenic bacteria, magnetic levitation, curli*

Received 12 December 2022. Revised 19 December 2022, 22 December 2022, 25 December 2022. Accepted 20 January 2023

For citation: Domnin P.A., Zakharchenko A.E., Rejepov D.T., Ermolaeva S.A. A magnetic levitation-based system to study the mechanisms of bacterial flocculation and autoaggregation. *Pacific Medical Journal.* 2023;1:38–43. doi: 10.34215/1609-1175-2023-1-38-43

Corresponding author: Svetlana A. Ermolaeva, Dr. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Ecology of Infectious Agents of the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia); ORCID 0000-0003-3396-6816; phone: +7 (499) 193-43-75; e-mail: drermolaeva@mail.ru

Принято считать, что бактерии существуют в двух состояниях: одиночные планктонные клетки и поверхностно-ассоциированные клеточные агрегаты, известные как биопленки. Бактериальные биопленки представляют собой ассоциированные с поверхностью трехмерные (3D) многослойные структуры,

© Домнин П.А., Захарченко А.Е., Реджепов Д.Т., Ермолаева С.А., 2023

образованные бактериями и самопродуцируемым матриксом, состоящим из экзополисахарида, белков, внеклеточной ДНК и липидов [1]. Механизмы защиты, обеспечиваемые биопленками, такие как ограниченная диффузия антибиотиков, накопление в матриксе ферментов, модифицирующих антибиотики, формирование клеток-персистеров, обеспечивают бактериям в биопленках в сотни раз более высокую устойчивость к антибиотикам и другим микробицидным средствам по сравнению с планктонными бактериями. Биопленки, образованные патогенными бактериями, играют важную роль в клинической патологии. Для изучения биопленок было разработано много экспериментальных подходов, включая использование микротитровальных планшетов, биоферментеров и *ex vivo* препаратов.

Развитие методов микроскопии позволило проводить анализ биопленок непосредственно в образцах, полученных из слизистых оболочек и эпителиальных тканей, суставов и хронических ран. Во многих случаях биопленки, связанные с хроническими заболеваниями, не были напрямую связаны с поверхностями тканей человека, а скорее левитировали в объеме физиологических жидкостей [2–4]. Такие не прикрепленные к поверхности агрегаты, образованные бактериями, внедренными в полимерный матрикс, были описаны для широкого круга патогенных бактерий, включая *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Achromobacter spp., Mycobacterium abscessus, Borrelia spp., Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Staphylococcus aureus*.

Для изучения свойств неприкрепленных агрегатов в последние годы появляется все больше моделей *in vitro*: проводится мониторинг агрегации бактерий в культурах без встряхивания в высоковязких средах, в блоках агара или в присутствии физиологических жидкостей [5]. Основным ограничением для моделей неприкрепленных агрегатов *in vitro* является седиментация агрегатов даже в высоковязких средах под действием гравитации, что ограничивает время наблюдения.

Ранее нами был предложен оригинальный подход к длительному наблюдению неприкрепленных агрегатов – использование системы магнитной левитации [6]. В результате воздействия неоднородного магнитного поля на атомные и молекулярные электроны вещество может притягиваться к магниту (пара- и ферромагнетики) или отталкиваться (диамагнетики). Вода и все живые существа диамагнитны. Если магнитная сила, действующая на диамагнитный объект, направлена вверх и достаточно сильна, чтобы уравновесить гравитационную силу, то достигается состояние магнитной левитации, которое схоже с состоянием невесомости [7]. Магнитная левитация широко используется в исследованиях и промышленности для создания условий, при которых объект подвешивается без поддержки, кроме магнитных полей, противодействующих гравитационным эффектам.

В этой работе мы использовали недавно разработанную систему магнитной левитации, которая предназначена для обеспечения биофабрикации тканевых сфероидов и ранее была использована нами для получения неседиментирующих автоагрегатов *E. coli* [6, 8]. Целью данной работы была оценка применимости системы для изучения автоагрегации грамотрицательных и грамположительных патогенных бактерий и выяснения механизмов, контролирующих автоагрегацию.

Материалы и методы

Штаммы, использованные в работе

В работе были использованы следующие штаммы из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи: *E. coli* O157:H7 ATCC43890, *P. aeruginosa* Pa103, *Listeria monocytogenes* EGDe, *S. aureus* Sa78. Все штаммы хранились в 10% глицерине при -70 °C и были размморожены перед началом экспериментов. Рутинно *E. coli* и *P. aeruginosa* культивировали на среде LB (Amresco, Испания), *L. monocytogenes* и *S. aureus* на среде BHI (BD, США) при 37 °C.

Выращивание бактерий в биоассемблере

Ночную культуру, выращенную в соответствующем питательном бульоне при 37 °C и шутелировании 180 об/мин в течение 16–18 часов, разводили в 100 раз в 2 мл питательного бульона, содержащего 20 мМ Гадовист® (непатентованное название гадобутрол ([10-[2,3-dihydroxi-1-(hydroxymethyl)propil]-1,4,7,10-tetraazacyclododexan-1,4,7-triacetin(3-)-N1, N4, N7, N10,O1, O4, O7]gadolinium)), стерильно добавленный непосредственно перед засевом. Емкость с культурой заклеивали парафином и помещали в биоассемблер, создающий условия необходимые для магнитной левитации.

Устройство биоассемблера было подробно описано в наших работах и работах наших коллег [6, 8].

Биоассемблер вместе с культурой бактерий помещали в термостат на температуру 37 °C и инкубировали в течение указанного в тексте времени. Для наблюдения за формированием агрегатов биоассемблер доставали из термостата и визуально или при помощи камеры фиксировали появление агрегата через специально сделанное смотровое отверстие, расположенное напротив области минимума магнитного поля. Для высевов среду отбирали иглой, проколов парафильм. Агрегат суспендировали в 2 мл физиологического раствора (150 мМ NaCl). Серийные 10-кратные разведения высевали на питательный агар, инкубировали 24 ч и проводили подсчет колоний, определяя абсолютные значения колониеобразующих единиц (КОЕ) в агрегате и в среде.

Окраска бактерий в агрегате дифференциальным красителем

Бактерии выращивали в биоассемблере, как описано выше, определяли объем агрегата, добавляли равный объем красителя Filmtracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit (ThermoFisher Scientific, США). Окрашивание проводили в течение 30 мин в темноте. Окрашенные агрегаты изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert (Carl Zeiss, Германия).

Подсчет зеленых и красных клеток осуществляли с помощью нейросети, как описано в [9].

Окраска бактерий на агаре и в агрегатах конго красным

Связывание конго красного использовали для выявления амилоидных белков курлей. Конго красный добавляли в агар LB до конечной концентрации 25 мкг/мл. Бактерии высевали с помощью бактериологической петли и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C. Связывающие конго красный колонии выглядели на агаре красными, не связывающие – белыми. Для окраски бактерий в агрегатах перед засевом бактерий в бульон, содержащий 20 мМ гадобутрол, добавляли конго красный до концентрации 25 мкг/мл. Выращивали бактерии в агрегате в течение 72 часов, осаждали бактерий центрифугированием в течение 10 минут при 4200 об/мин, удаляли среду, как описано выше, и тщательно ресуспендировали в 2 мл 50% этанола, после чего еще раз осаждали бактерий центрифугированием в течение 10 минут при 4200 об/мин. Выход конго красного в спирт определяли с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм.

Получение мутантов клонов E. coli с увеличенной способностью к продукции курлей

Десятикратные разведения ночной культуры штамма *E. coli* ATCC43890 высевали на агар LB, содержащий 25 мкг/мл конго красного. Инкубировали при 37 °C. Через 24–48 часов культуру рассматривали на предмет появления красных колоний среди белых. Красные колонии аккуратно отбирали и пересевали на такой же агар. Клоны, сохраняющие красную окраску после трех пересевов, оставляли для дальнейших экспериментов.

Статистика

Все эксперименты повторяли не меньше трех раз. Средние и квадратичные отклонения обсчитывали в программе Excel. Для определения достоверности различий применяли критерий Стьюдента. Достоверными считали различия с $p < 0,05$.

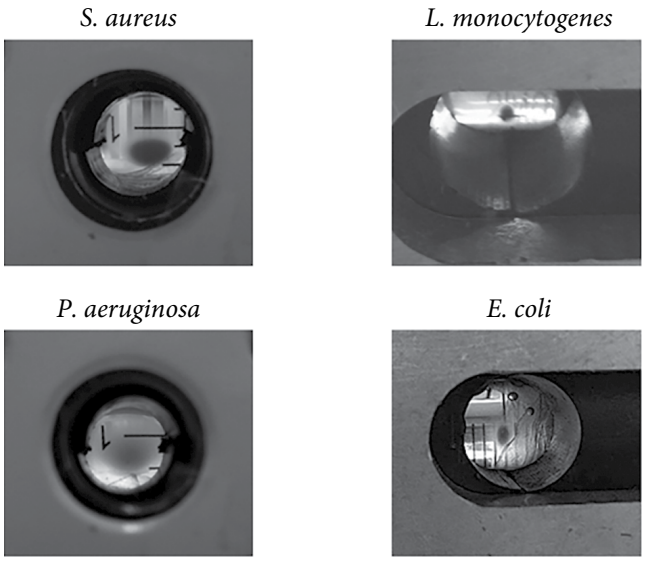

Рис. 1. Неприкрепленные агрегаты, сформированные четырьмя видами патогенных бактерий через 72 часа после начала эксперимента.

Результаты исследования

Формирование неприкрепленных автоагрегатов патогенными бактериями

В работе использовали 4 штамма патогенных бактерий, включая грамположительные *S. aureus* и *L. monocytogenes* и грамотрицательные *P. aeruginosa* и *E. coli* O157:H7. Согласно ранее полученным с *E. coli* данным, после помещения равномерной суспензии в биоассемблер видимые агрегаты в центре рабочего объема появляются в течение 12–24 часов [6]. Действительно, спустя 24 часа все протестированные штаммы собрались в центре рабочего объема (рис. 1). Продолжение инкубации в течение дополнительных 48 часов не изменяло внешний вид автоагрегатов.

Для того чтобы проанализировать жизнеспособность бактерий в автоагрегатах, проводили окраску автоагрегатов дифференциальным красителем Filmtracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit (рис. 2). Окраска дифференциальным красителем показала, что процент живых бактерий в автоагрегатах составлял от 82 (*E. coli*) до 99% (*L. monocytogenes*).

Для характеристики относительного количества живых бактерий в автоагрегате и вне его были сделаны высевы разведений суспензии, полученной из автоагрегата, сформированного *E. coli* (рис. 3). Согласно высевам, количество живых бактерий в агрегате составляло $1,2 \times 10^8$ КОЕ, а в среде – $0,7 \times 10^8$ КОЕ.

Увеличенная продукция курлей увеличивает эффективность формирования неприкрепленных автоагрегатов E. coli

Мы поставили задачу на основе штамма *E. coli* O157:H7 ATCC43890 отобрать продуцирующий курли, но не формирующий биопленки мутант. Неспособность формировать биопленки мутантом необходима была для выявления механизмов, влияющих на формирование агрегатов, но не биопленок. С целью получения такого мутанта разведения ночной культуры высевали на питательный агар, содержащий конго красный и отбирали красные колонии среди белых колоний родительского штамма, не продуцирующего курли. Красные колонии отбирались с частотой 2 на 1000 белых колоний. 4 из 16 отобранных колоний сохраняли красный цвет при последовательных пересевах (рис. 4). Ни один из отобранных мутантов не формировал биопленки так же, как и родительский штамм ATCC43890 (данные не показаны). В дальнейших экспериментах был использован один из 4 отобранных мутантов.

Мутантный и родительский штаммы были выращены в биоассемблере. Для оценки продукции курлей при формировании автоагрегатов использовали конго красный, который был добавлен в среду роста (см. материалы и методы). Связанный с агрегатом краситель был затем смыт, и его количество определяли фотометрически. Количество конго красного, связанного

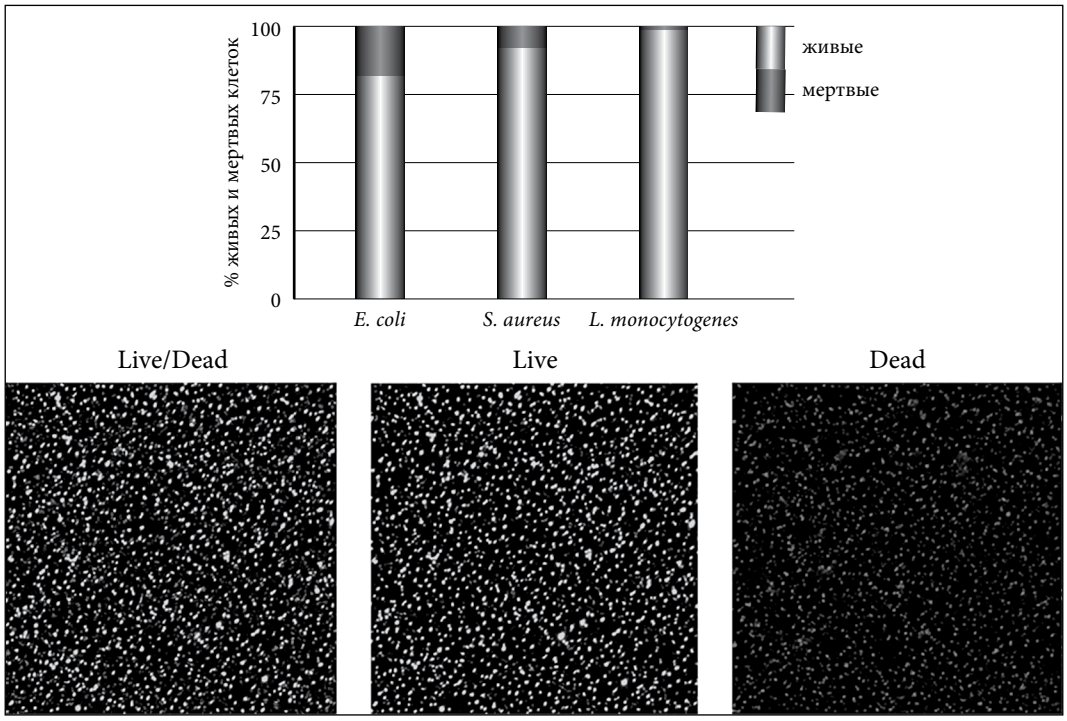

Рис. 2. Относительное количество живых и мертвых бактерий в агрегате через 72 часа после начала эксперимента. Показана окраска агрегата, сформированного *E. coli*, красителем Live/Dead. Для других видов приведены только численные данные.

агрегатами, сформированными мутантом, превышало количество красителя, связанного агрегатами дикого штамма, в 2,3 раза (рис. 4). Этот результат свидетельствует о том, что при формировании неприкрепленных агрегатов мутантом наблюдалась повышенная продукция курлей.

Увеличенная продукция курлей сопровождалась существенным увеличением доли бактерий в агрегате относительно свободноплавающих бактерий. Если у дикого типа отношение количества бактерий в агрегате и в среде составляло 1,8, то у мутанта это соотношение равнялось 12,1. Таким образом, полученные данные указывают, что увеличение производства курлей увеличивает эффективность формирования автоагрегатов.

Обсуждение полученных данных

Отсутствие внешней опорной поверхности при формировании неприкрепленных агрегатов является важным отличием, указывающим на ограничения существующих моделей биопленок *in vitro* [10]. Скорее такие автоагрегаты, сформированные одним видом бактерий и не прикрепленные к поверхности, напоминают флокулы, хорошо известные микробиологам, изучающим поведение бактерий в естественных водоемах. Бактериальная флокуляция в объеме жидкости – процесс, типичный для природных водных экосистем, который используется в промышленности для очистки сточных вод и других приложений [11]. Природные флокулы обычно включают несколько/много видов микроорганизмов. Однако структурно неприкрепленные (авто)агрегаты, формируемые патогенными бактериями в организме человека, и поливидовые флокулы природных водоемов имеют характеристики, общие с прикрепленными к поверхности биопленками, являясь трехмерными структурами, включающими бактериальные клетки и внеклеточный матрикс [2]. Как и биопленки, неприкрепленные агрегаты обеспечивают повышенную устойчивость к противомикробным препаратам [5]. С другой стороны, такие особенности, как потребность в бактериальной подвижности, состав матрикса и механизмы регуляции, могут различаться между неприкрепленными агрегатами и классическими биопленками [10].

Для выращивания неприкрепленных бактериальных агрегатов мы использовали ранее описанную систему магнитов, названную биоассемблер [6, 8]. Магнитное поле в этой системе уменьшается к центру рабочего объема, что оказывает эффект на диамагнитные объекты, такие как бактерии, перемещая их в направлении уменьшения поля и обеспечивая

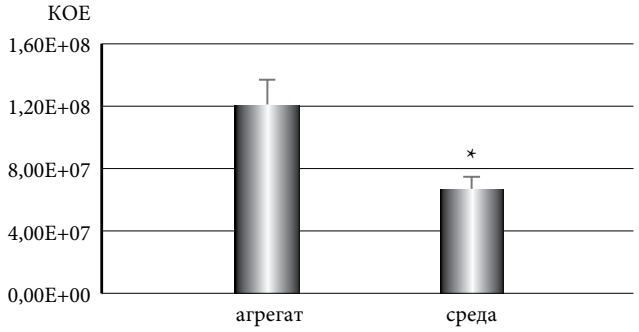

Рис. 3. Количество живых бактерий в агрегате, сформированном *E. coli*, и в окружающей агрегат среде. Показаны средние значения и среднеквадратичные отклонения. * $p < 0,05$

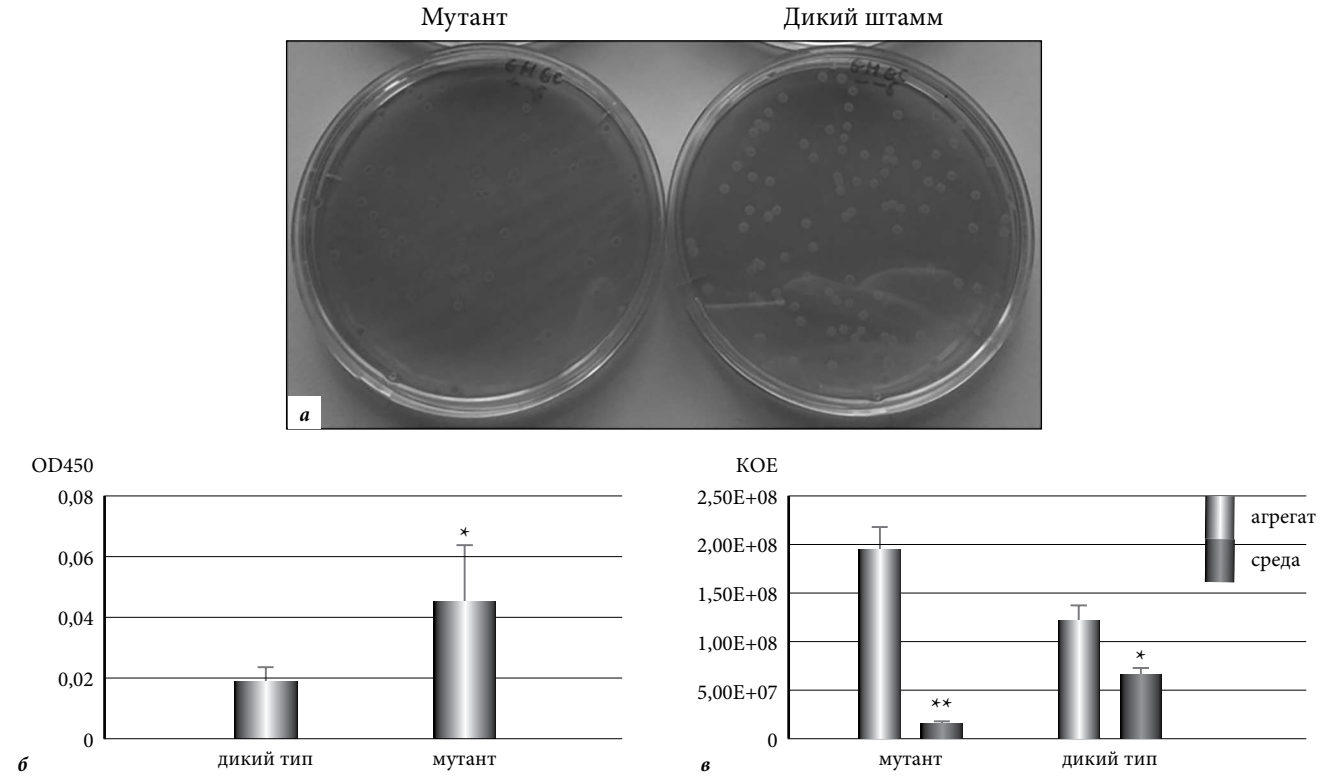

Рис. 4. Характеристика штаммов *E. coli* дикого типа и мутантного. Связывание конго красного при выращивании на агаре LB, связывание конго красного при выращивании в неприкрепленном агрегате, количество бактерий в агрегате и в среде. Показаны средние значения и среднеквадратичные отклонения. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

концентрацию в центре рабочего объема. В большинстве аналогичных используемых систем магнитной левитации магниты разнесены в пространстве, что определяет альтернативную конфигурацию градиента магнитного поля, которая не собирает клетки в центре объеме, а, напротив, позволяет им разделиться в соответствии с их плавучестью [12].

Биоассемблер включал два специально сконфигурированных постоянных магнита из сплава NdFeB (неодим-железо-бор). Неодимовые магниты, хотя и самые сильные среди постоянных магнитов, не позволяют получить значения плотности магнитного потока выше 2 Т и сами по себе не могут создать магнитную силу, достаточную для магнитной левитации [8]. Проблема магнитной левитации с использованием относительно слабых магнитных полей, создаваемых постоянными магнитами, была ранее успешно решена путем включения в состав питательных сред парамагнитных или супермагнитных жидкостей [6, 8]. В данной работе мы использовали раствор гадобутрола – комплексного соединения редкоземельного элемента гадолиния. Гадобутрол под торговой маркой Гадовист® и другими используется при проведении МРТ, и его низкая токсичность была неоднократно протестирована [8].

Нашей целью было использование разработанной системы для анализа регуляторных механизмов, контролирующих формирование автоагрегатов патогенными бактериями. В частности, нас интересовало, как будут влиять на формирование автоагрегатов мутации, влияющие на выработку курлей, поверхностных структур, состоящих из амилоидных белков и играющих важную роль в формировании биопленок *E. coli* [1].

Токсинпродуцирующие *E. coli*, относящиеся к серотипу O157:H7, не формируют биопленки и не продуцируют курли. Это связано с тем, что кодирующий Шига-подобный токсин stx1профаг расположен в кодирующей области гена *mlrA*, нарушая тем самым продукцию регуляторного белка [13]. Однако неоднократно было показано, что *E. coli* O157:H7 с высокой частотой выщепляют мутации, приводящие к продукции курлей [13, 14]. Некоторые из этих мутаций связаны с утратой профага, и тогда полностью восстанавливается не только продукция курлей, но и способность штамма формировать биопленки [13]. В других случаях мутант получает способность продуцировать курли, но биопленки не формирует, что обычно связано с мутациями в альтернативных частях генома [14].

Полученные в данной работе данные указывают на то, что курли влияют на формирование неприкрепленных автоагрегатов *E. coli* O157:H7; а также что увеличение производства курлей, не влияющее на способность *E. coli* O157:H7 формировать биопленки, увеличивает эффективность формирования автоагрегатов. Эти результаты подтверждают ранее сделанные нами выводы о том, что способность формировать биопленки и способность формировать неприкрепленные автоагрегаты у *E. coli* регулируются независимо [6], хотя с большой вероятностью можно утверждать, что контролирующие эти процессы регуляторные пути пересекаются. На последнее указывает

то, что курли, вовлеченные в формирование неприкрепленных агрегатов, также являются существенным элементом биопленок, формируемых штаммами других серотипов *E. coli*, а также *S. typhimurium*.

Заключение

Приведенные результаты показывают, что использованная нами система позволяет получить левитирующие в объеме жидкости неприкрепленные автоагрегаты, сформированные как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями. Бактерии, находясь в составе агрегатов, длительное время сохраняют жизнеспособность. Используя разработанную систему и модель энтеропатогенной *E. coli* O157:H7, мы показали, что автоагрегаты *E. coli* включают амилоидные белки курлей, а мутации, влияющие на производство курлей, влияют на эффективность формирования автоагрегатов. Описанный метод создания автоагрегатов, не прикрепленных к поверхности, вместе с предложенными количественными методами может быть использован в будущем для исследования механизмов автоагрегации и флокуляции бактерий.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: *научное исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения России, тема № 056-00093-22-04 «Разработка тест-системы для экспресс-определения антибиотикорезистентности патогенных бактерий на основе in situ анализа подвижности бактериальных клеток».*

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – САЕ
Сбор и обработка материала – ПАД, АЕЗ, ДТР
Статистическая обработка – ПАД
Написание текста – САЕ
Редактирование – ПАД

Литература / References

1. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15:167–93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.3
2. Alhede M, Kragh KN, Qvortrup K, Allesen-Holm M, van Gennip M, Christensen LD, Jensen PØ, Nielsen AK, Parsek M, Wozniak D, et al. Phenotypes of non-attached Pseudomonas aeruginosa aggregates resemble surface attached biofilm. *PLoS One.* 2011:6. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0027943
3. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003;01: 105–7. doi: 10.1126/SCIENCE.1084550
4. Nielsen SM, Nørskov-Lauritsen N, Bjarnsholt T, Meyer RL. Achromobacter Species Isolated from Cystic Fibrosis Patients Reveal Distinctly Different Biofilm Morphotypes. *Microorganisms.* 2016;4:33. doi: 10.3390/MICROORGANISMS4030033
5. Gilbertie JM, Schnabel LV, Hickok, NJ, Jacob ME, Conlon BP, Shapiro IM, Parviz J, Schaer TP. Equine or porcine synovial fluid as a novel ex vivo model for the study of bacterial free-floating biofilms that form in human joint infections. *PLoS One.* 2019;14:e0221012. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0221012
6. Domnin P, Arkhipov A, Petrov S, Sysolyatina E, Parfenov V, Karalkin P, Mukhachev A, Gusarov A, Moisenovich M, Khesuani Y, et al. An In Vitro Model of Nonattached Biofilm-Like Bacterial Aggregates Based on Magnetic Levitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020;86:e01074-20. doi: 10.1128/AEM.01074-20
7. Berry MV, Geim AK. Of flying frogs and levitrons. *Eur. J. Phys.* 1997;18:307. doi: 10.1088/0143-0807/18/4/012
8. Parfenov VA, Koudan EV, Bulanova EA, Karalkin PA, Das Pereira F, Norkin NE, Knyazeva AD, Gryadunova AA, Petrov OF, Vasiliev MM, et al. Scaffold-free, label-free and nozzle-free biofabrication technology using magnetic levitational assembly. *Biofabrication.* 2018;10:034104. doi: 10.1088/17585090/aac900
9. Domnin PA, Parfenov VA, Kononikhin AS, Petrov SV, Shevlyagina NV, Arkhipova AY, Koudan EV, Nezhurina EK, Brzhozovskiy AG, Bugrova AE, et al. Combined Impact of Magnetic Force and Spaceflight Conditions on Escherichia coli Physiology. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:1837. doi: 10.3390/ IJMS23031837
10. Kalinin EV, Chalenko YM, Sysolyatina EV, Midiber KY, Gusarov AM, Kechko OI, Kulikova AA, Mikhaleva LM, Mukhachev AY, Stanishevskyi YM. Bacterial hepatocyte growth factor receptor agonist stimulates hepatocyte proliferation and accelerates liver regeneration in a partial hepatectomy rat model. *Drug Dev. Res.* 2021;82:123–32. doi: 10.1002/ ddr.21737
11. Roberts, AEL, Kragh KN, Bjarnsholt T, Diggle SP. The Limitations of In Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection. *J. Mol. Biol.* 2015;427:3646–61. doi: 10.1016/J.JMB.2015.09.002
12. Heidari M. Role of Natural Flocculation in Eliminating Toxic Metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2019;76:366–74. doi: 10.1007/S00244-019-00597-X
13. Durmus NG, Tekin HC, Guven S, Sridhar K, Yildiz AA, Calibasi G, Ghiran I, Davis RW, Steinmetz LM, Demirci U. Magnetic levitation of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015;112;E3661–8.
14. Chen CY, Nguyen LHT, Cottrell BJ, Irwin PL, Uhlich GA. Multiple mechanisms responsible for strong Congo-red-binding variants of Escherichia coli O157:H7 strains. *Pathog. Dis.* 2016;74:ftv123. doi: 10.1093/FEMSPD/FTV123
15. Sharma VK, Bayles DO, Alt DP, Looft T, Brunelle BW, Stasko JA. Disruption of rcsB by a duplicated sequence in a curli-producing Escherichia coli O157:H7 results in differential gene expression in relation to biofilm formation, stress responses and metabolism. *BMC Microbiol.* 2017;17:56. doi: 10.1186/ s12866-017-0966-x