

**Ветеринарная медицина**

УДК 579.62:[573.6.086.83+577.21]

doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.364rus

**БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ШТАММА *Escherichia coli* ŽP. Сообщение I. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОЛИЦИНА ПРИ КОНЪЮГАТИВНОЙ ДОСТАВКЕ *colE7* В КЛЕТКИ АРЕС *in vitro* И *in vivo*\***М.В. КУЗНЕЦОВА<sup>1</sup>, И.Л. МАСЛЕННИКОВА<sup>1</sup>, Ю.С. ГИЗАТУЛЛИНА<sup>1</sup>,  
D. ŽGUR BERTOK<sup>2</sup>, M. STARČIĆ ERJAVEC<sup>2</sup>

Обеспечение защиты сельскохозяйственных животных от инфекционных болезней — приоритетное направление ветеринарной медицины. Широкое распространение в птицеводческих хозяйствах патогенных и условно-патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам, требует разработки современных способов поддержания здоровья птицы при ее промышленном производстве. В качестве меры по предупреждению и ограничению распространения возбудителей с устойчивостью к противомикробным агентам перспективно использование бактериальных препаратов направленного действия — пробиотиков. В настоящей работе в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* мы впервые показали антагонистическое действие генно-модифицированного штамма *Escherichia coli* ŽP против возбудителей эшерихиозов у птиц — АРЕС (avian pathogenic *Escherichia coli*). Установлено, что *in vitro* конъюгативный перенос гена *colE7* в клетки АРЕС проходит эффективно в условиях как планктонного роста, так и формирующейся биопленки. *In vivo* штамм *E. coli* ŽP способен активно заселять кишечник крыс и маньчжурских перепелов и сохраняться там, способствуя нормализации микробиоты животных. Цель исследования — оценка эффективности килинга клеток АРЕС при конъюгативном переносе гена колицина E7 и определение конкурентоспособности штамма *E. coli* ŽP *in vitro* и *in vivo*. В работе использовали ColE7-опосредованную kill—anti-kill систему на основе пробиотического штамма Nissle 1917, включающую генно-модифицированный штамм *E. coli* ŽP (киллерный донор), несущий на конъюгативной плазмиде рOX38a ген колицина E7 (*colE7*) с ДНКазной активностью, а также ген *immE7* в хромосоме, и штамм *E. coli* N4i без *colE7* на плазмиде (контрольный донор). В качестве реципиентов использовали устойчивые к ампициллину штаммы АРЕС ( $n = 6$ ), изолированные из внутренних органов инфицированных цыплят-бройлеров. Филогенетическую принадлежность культур определяли методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (quadriplex PCR). Конъюгативный перенос осуществляли в среде Луриа-Бертани (LB) в течение 6 и 24 ч в планктонной культуре и в биопленке в полистироловых плоскостонных иммунологических 96-луночных планшетах. Опыты на крысах (линия Wistar) и маньчжурских перепелах (*Coturnix coturnix*) выполняли в виварии (ГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера МЗ РФ). Нами экспериментально подтверждена конкурентоспособность *E. coli* ŽP при совместном культивировании с клетками АРЕС штаммов, в том числе продуцентами бактериоцинов, в различных моделях. Доказан конъюгативный перенос гена *colE7* в клетки АРЕС *in vitro* в условиях планктонного роста и формирующейся биопленки: в экспериментах с донорным штаммом *E. coli* N4i частота конъюгации варьировала в пределах  $10^{-6}$ – $10^{-2}$ . Эксперимент *in vivo* показал, что штамм *E. coli* ŽP способен эффективно заселять кишечник крыс и маньчжурских перепелов, сохраняясь там, как минимум, в течение 1 мес. Введение клеток *E. coli* ŽP с питьевой водой увеличивало общее содержание комменсальных эшерихий в кишечнике, подавляя развитие патогенных представителей этого вида без заметного влияния на молочнокислую и бифидофлору. Доказана возможность конъюгативного переноса плазмиды от донора *E. coli* N4i в условиях кишечного тракта обоих видов животных, который происходил с высокой частотой (в среднем  $10^{-2}$ ). В экспериментах *in vitro* и *in vivo* с *E. coli* ŽP трансконъюганты обнаружены не были, то есть клетки реципиентов, получившие ген *colE7* посредством конъюгативного переноса, экспрессировали его и были лизированы вследствие ДНКазной активности колицина. В группах, получавших штамм ŽP, также отмечено снижение числа реципиентов АРЕС. Полученные результаты свидетельствуют, что штамм *E. coli* ŽP способен эффективно заселять кишечник животных и обладает антибактериальной активностью против энтеропатогенов за счет конъюгативного механизма передачи гена колицина. Он эффективно действует на резистентные и толерантные к бактериоцинам клетки, что позволяет предположить возможность создания на его основе высокоэффективного пробиотического препарата нового поколения.

Ключевые слова: колицины, ColE7, конъюгативный перенос, kill—anti-kill система, аль-

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/792, а также Словенского исследовательского агентства (ARRS), гранты № P1-0198 и № BI-RU/16-18-047.

Птицеводство — один из наиболее быстрорастущих сегментов сельского хозяйства (1, 2). Для повышения эффективности производства птицы широко используются различные кормовые добавки, такие как синтетические гормоны и антибактериальные препараты (3). Многолетнее применение антибиотиков привело к формированию устойчивых к этим веществам грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, которые становятся основной причиной гибели молодняка на птицефабриках (4, 5). Кроме того, инфицированные особи промышленного стада служат резервуаром возбудителей острых кишечных инфекций для человека (6). В 2014 году Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ, World Health Organization, WHO) принята стратегия, предусматривающая ограничение использования антибактериальных препаратов для профилактики инфекционных заболеваний в сельском хозяйстве (7). В 2017 году к этой программе присоединилась Россия (8).

Перспективным направлением в рамках совершенствования мер по предупреждению и ограничению распространения возбудителей с устойчивостью к противомикробным агентам считается использование пробиотиков — бактериальных препаратов направленного действия, которым отводится ведущая роль при замене антибиотиков (9, 10). Пробиотики представляют собой моновидовую или смешанную культуру живых клеток микроорганизмов, которые применяются в качестве кормовых добавок и действуют как стимулятор роста, а также благотворно влияют на физиологические параметры и микробиоту хозяина (11, 12). Уже в первые часы жизни животных их кишечник искусственно заселяют штаммами бактерий и/или биокомплексами, обеспечивающими антагонистическое действие в отношении патогенных или условно-патогенных микроорганизмов. Такой эффект достигается за счет конкурентного вытеснения последних бактериями, продуцирующими антибактериальные вещества — бактериоцины, которые угнетают представителей близкородственных таксонов. Имеется значительное количество сообщений о положительном опыте применения пробиотиков для профилактики и лечения инфекций у птицы (1, 13-15). Существенное внимание уделяется искусственно сконструированным штаммам с множественной продукцией бактериоцинов (16-19). Например, в связи с утратой антагонистических свойств пробиотическим штаммом *Escherichia coli* M17 предложено восстановить его конкурентоспособность в условиях кишечника животных с помощью рекомбинантных плазмид, детерминирующих продукцию колицина E1 (20) или микроцина C51 (21). Тем не менее даже эти препараты могут быть недостаточно эффективными из-за появления бактериоциноустойчивых бактерий (22) с модифицированными поверхностными рецепторами и транслокационными системами. Возможным решением этой проблемы может стать использование альтернативного механизма доставки колицинов на основе горизонтального переноса *col*-генов при участии конъюгативных плазмид (23), что позволит воздействовать на резистентные и толерантные к бактериоцинам штаммы бактерий.

Антимикробная бактериальная kill—anti-kill система была апробирована с референтным (*E. coli* K-12 TG1) и уropатогенным (*E. coli* DL82) штаммами. С помощью ПЦР в реальном времени, биолюминесцентного метода и проточной цитометрии подтверждено, что плазида рOX38a переносит *colE7* в клетку реципиента, где начинается его немедленная тран-

скрипция и синтез бактериоцина, который убивает получателя (24).

В настоящей работе в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* мы впервые показали антагонистическое действие генно-модифицированного штамма *E. coli* ŽP против возбудителей эшерихиозов у птиц — АРЕС (avian pathogenic *Escherichia coli*). Установлено, что *in vitro* конъюгативный перенос гена *colE7* в клетки АРЕС проходит эффективно в условиях как планктонного роста, так и формирующейся биопленки. *In vivo* штамм *E. coli* ŽP способен активно заселять кишечник крыс и маньчжурских перепелов и сохраняться там, способствуя нормализации микробиоты животных. Выявлено, что в условиях кишечного тракта конъюгативный перенос плазмиды от донора в штаммы АРЕС происходит с высокой частотой, в результате чего колицин действует на резистентные и толерантные к бактериоцинам клетки, что позволяет предположить возможность создания на этой основе высокоэффективного пробиотического препарата нового поколения.

Цель нашего исследования — оценка эффективности киллинга клеток АРЕС (avian pathogenic *Escherichia coli*) при конъюгативном переносе гена колицина E7, а также конкурентоспособности штамма *Escherichia coli* ŽP *in vitro* и *in vivo*.

**Методика.** В работе использовали ColE7-опосредованную kill—anti-kill систему на основе пробиотического штамма Nissle 1917, включающую генно-модифицированный штамм *E. coli* ŽP pOX38a Gm<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup> (киллерный донор, KD), несущий на конъюгативной плазмиде ген колицина E7 (*colE7*) с ДНКазной активностью, а также ген *immE7* в хромосоме, и штамм *E. coli* N4i pOX38 Gm<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup> (контрольный донор, D) без *colE7* на плазмиде (25). Реципиентами (R) были устойчивые к ампициллину штаммы *E. coli* ( $n = 6$ ), выделенные из внутренних органов инфицированных цыплят-бройлеров (АРЕС). Культуры имели индивидуальный генетический профиль согласно гер-ПЦР типированию с праймерами ERIC 1R/ERIC 2 (26). Филогенетическую принадлежность изолятов определяли методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (quadriplex PCR) (27). Праймеры, использованные в работе, синтезированы в ООО «Синтол» (г. Москва). Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США).

Штаммы были сохранены в коллекции культур промышленных микроорганизмов (Zbirka industrijskih mikroorganizmov, ZIM) биотехнологического факультета Университета Любляны (Univerza v Ljubljani, Словения).

Скрининг культур АРЕС на чувствительность к бактериоцинам проводили с использованием коллекции индикаторных штаммов-продуцентов бактериоцинов и микроцинов ВЗВ (Университет Любляны) с помощью техники двойного слоя по методу отсроченного антагонизма (22). В качестве контрольного (чувствительного к бактериоцинам) штамма использовали *E. coli* DH5 $\alpha$ . Продукцию бактериоцинов штаммами АРЕС и чувствительность *E. coli* ŽP к бактериоцинам исследуемых штаммов оценивали аналогичным методом (22).

Конъюгативный перенос осуществляли в среде Луриа-Бертани (LB) («Amresco», США) в течение 6 и 24 ч в планктонной культуре и в биопленке в полистироловых плоскодонных иммунологических 96-луночных планшетах («Ленполимер», Россия).

Конъюгативную смесь формировали из 100-кратно разведенных ночных культур (стандартизованных до 2,0 по стандарту мутности McFarland) донора и реципиента в соотношении 1:4. Предварительно отмытые

(0,89 % NaCl) биопленки разрушали ультразвуком (37 Гц, Elmasonic 30S, «Elma Schmidbauer GmbH», Германия) в 100 мкл физиологического раствора в течение 1 мин (5 циклов). Число колониеобразующих единиц (КОЕ) подсчитывали на селективных агаризованных средах с учетом разведения: трансконъюганты учитывали на LB-среде с добавлением антибиотиков хлорамфеникола (50 мкг/мл) и ампициллина (50 мкг/мл), клетки реципиента — на LB-среде с ампициллином (50 мкг/мл), клетки донора — на LB-среде с гентамицином (40 мкг/мл). Частоту конъюгативного переноса (Y) оценивали как отношение числа КОЕ клеток-трансконъюгантов (T) к количеству КОЕ клеток-реципиентов (R) (28).

Биомассу биопленок определяли по методике J.H. Merritt с соавт. (29) на микропланшетном ридере Benchmark Plus («Bio-Rad», США) при  $\lambda = 570$  нм в единицах оптической плотности (OD).

Совместный рост бактерий оценивали с использованием богатой (LB) и бедной (M9) сред в лунках полистиролового плоскодонного иммунологического 96-луночного планшета при 37 °С с 1-х по 3-и сут. Высев проводили из десятичных разведений бактериальной суспензии на соответствующие селективные агаризованные среды с антибиотиками.

Опыты на крысах (линия Wistar) и маньчжурских перепелах (*Coturnix coturnix*) выполняли в виварии на базе ГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера МЗ РФ. Условия содержания (плотность посадки, фронт кормления и поения, температура, влажность, освещенность) были в пределах норм, рекомендуемых ВНИТИП. Общий уход за крысами и птицей осуществляли в соответствии с ГОСТ 34088-2017 (30).

Эксперимент по конъюгативному переносу *in vivo* проводили в два этапа. В первом эксперименте использовали самцов 30-суточных крыс массой  $175,25 \pm 10,31$  г, разделенных на три группы по 10 особей в каждой. Крыс содержали 21 сут в пластиковых клетках (по 5 особей в клетке) в отопляемом (температурный режим 21-23 °С) и вентилируемом помещении с естественным освещением, доступ к корму и воде *ad libitum*. Живые клетки контрольного (I группа) и киллерного (II группа) донора вводили с водой в концентрации  $10^8$  бактерий/гол. в течение 7 сут. Заселение кишечника на 3-и и 6-е сут эксперимента определяли, высевая фекалии на селективные среды. С 8-х до 21-х сут в обеих опытных группах с водой вводили живые клетки штамма APES, устойчивого к ампициллину (реципиент), в концентрации  $10^8$  бактерий/гол., через 6 ч меняли воду и вводили донорные штаммы. Контрольная группа не получала ни один из штаммов *E. coli*. Наличие в кишечнике ампициллиноустойчивых реципиентов, контрольного/киллерного донора и трансконъюгантов определяли на 10-е, 14-е и 21-е сут эксперимента.

На втором этапе эксперимента использовали маньчжурских перепелов массой  $114,0 \pm 7,50$  г, которых разделили на три группы по 5 особей в каждой и содержали в условиях, аналогичных таковым на первом этапе, в течение 1 нед. Живые клетки контрольного (группа I) и киллерного (группа II) донора вводили с водой ( $10^8$  бактерий/гол.) в течение 3 сут, ежедневно контролируя заселение кишечника высевом фекалий на селективные среды. Со 2-х по 6-е сут эксперимента в обеих опытных группах вводили живые клетки штамма APES, устойчивого к ампициллину ( $10^8$  бактерий/гол.), через 6 ч меняли воду и вводили донорные штаммы. Контрольная группа не получала ни один из штаммов *E. coli*. Присутствие в кишечнике устойчивых к ампициллину реципиентов и трансконъюгантов определяли на 2-е, 3-и и 6-е сут.

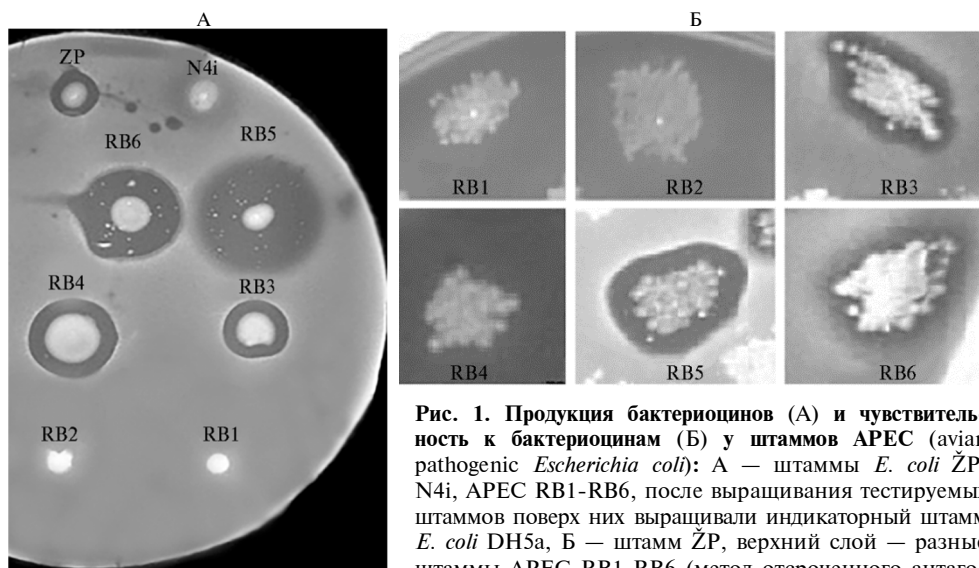
На обоих этапах эксперимента число жизнеспособных клеток считывали на 1 г фекалий, частоту конъюгации определяли аналогично эксперименту *in vitro*.

Статистический анализ осуществляли в программах Microsoft Office Excel и STATISTICA 10 («StatSoft, Inc.», США). Результаты представлены в виде среднего арифметического ( $M$ ) и его ошибки ( $\pm SEM$ ). Достоверность различий средних величин оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента при  $p < 0,05$ , связь между количественными значениями — с использованием линейного коэффициента корреляции Пирсона ( $r_p$ ).

**Результаты.** Согласно quadruplex ПЦР, использованные в работе штаммы АРЕС принадлежали к филогенетическим группам В1, В2 и Е. Колициногенная была выявлена у четырех культур, одна из которых оказалась нечувствительной к бактериоцину ColE7 (рис. 1, табл. 1). Все АРЕС были устойчивы к десяти и более бактериоцинам, в том числе с пороформирующим, ДНКазным, рРНКазным, тРНКазным механизмами действия.

### 1. Характеристика штаммов *Escherichia coli*, изолированных из внутренних органов инфицированных цыплят-бройлеров (avian pathogenic *E. coli*, АРЕС)

Штамм АРЕС	Филогруппа	Продукция бактериоцинов	Резистентность к колицинам	Резистентность к микроцинам
RB1	B1	Нет	A, B, D, E1, E3, E5, E7, Ia, Ib, K, N, M, S4	B17, C7, V
RB2	E	Нет	A, B, D, E1, E5, E7, Ia, Ib, K, N, M, S4	C7, V
RB3	E	Есть	A, B, D, E1, E2, E3, Ia, Ib, K, N, M, S4	B17, C7, V
RB4	E	Есть	A, B, D, E1, E, E5, E7, E8J, Ia, Ib, K, N, M	B17, C
RB5	B1	Есть	A, B, D, E1, E5, E6, Ia, Ib, K, N, M, S4	B17, C7, V
RB6	B2	Есть	A, B, D, Ia, Ib, N, M, S4	B17, C7, V



**Рис. 1.** Продукция бактериоцинов (А) и чувствительность к бактериоцинам (Б) у штаммов АРЕС (avian pathogenic *Escherichia coli*): А — штаммы *E. coli* ZP, N4i, АРЕС RB1-RB6, после выращивания тестируемых штаммов поверх них выращивали индикаторный штамм *E. coli* DH5a, Б — штамм ZP, верхний слой — разные штаммы АРЕС RB1-RB6 (метод отсроченного антагонизма).

В экспериментах с контрольным донорным штаммом *E. coli* N4i частота конъюгативного переноса в течение 6 ч варьировала в пределах  $10^{-6}$ - $10^{-2}$  и оказалась выше в формирующейся биопленке, чем в планктоне (соответственно  $1,73 \times 10^{-2} \pm 2,24 \times 10^{-2}$  и  $2,27 \times 10^{-5} \pm 2,40 \times 10^{-5}$ ), а в течение 24 ч была сопоставима в обеих моделях ( $4,45 \times 10^{-4} \pm 5,46 \times 10^{-4}$  против  $6,25 \times 10^{-3} \pm 8,63 \times 10^{-3}$ ) (табл. 2). Модель биопленки была необходима, поскольку *in vivo*, в том числе в кишечном тракте, микроорганизмы существуют в основном в составе прикрепленных сообществ. При переносе в течение 24 ч корреляция между передачей плазмиды в планктоне и био-

**2. Число клеток доноров, реципиентов, трансконогянгов (КОЕ/мл) и частота конъюгации в планктоне и биопленке в экспериментах по конъюгативному переносу плазмиды pOX38 в штаммы АРЕС (avian pathogenic *Escherichia coli*) in vitro ( $M \pm SEM$ )**

Штамм АРЕС	I группа, <i>E. coli</i> N4i (контрольный донор)				II группа, <i>E. coli</i> ЖР (киллерный донор)			
	D	R	T	Y	KD	R	T	Y
	П л а н к т о н							
RB1	$1,04 \times 10^7 \pm 1,13 \times 10^6$	$1,70 \times 10^8 \pm 2,50 \times 10^7$	$2,10 \times 10^5 \pm 7,25 \times 10^4$	$1,33 \times 10^{-3} \pm 6,22 \times 10^{-4}$	$3,14 \times 10^7 \pm 2,13 \times 10^6$	$9,13 \times 10^7 \pm 3,75 \times 10^6$	0,00	0,00
RB2	$1,76 \times 10^6 \pm 6,63 \times 10^5$	$1,16 \times 10^8 \pm 1,13 \times 10^7$	$2,62 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^6$	$2,46 \times 10^{-2} \pm 2,13 \times 10^{-2}$	$8,43 \times 10^7 \pm 5,08 \times 10^7$	$3,86 \times 10^7 \pm 3,63 \times 10^6$	0,00	0,00
RB3	$5,71 \times 10^7 \pm 2,79 \times 10^7$	$5,50 \times 10^7 \pm 2,25 \times 10^7$	$2,16 \times 10^5 \pm 2,01 \times 10^5$	$2,92 \times 10^{-3} \pm 2,46 \times 10^{-3}$	$1,70 \times 10^8 \pm 3,40 \times 10^7$	$6,80 \times 10^7 \pm 1,45 \times 10^7$	0,00	0,00
RB4	$1,74 \times 10^6 \pm 5,63 \times 10^5$	$3,65 \times 10^8 \pm 1,56 \times 10^7$	$1,84 \times 10^5 \pm 1,66 \times 10^5$	$5,03 \times 10^{-4} \pm 4,55 \times 10^{-4}$	$2,03 \times 10^7 \pm 1,45 \times 10^7$	$1,59 \times 10^8 \pm 3,63 \times 10^7$	0,00	0,00
RB5	$2,36 \times 10^7 \pm 7,63 \times 10^6$	$2,89 \times 10^8 \pm 4,88 \times 10^7$	$1,13 \times 10^4 \pm 1,25 \times 10^3$	$3,94 \times 10^{-5} \pm 2,31 \times 10^{-6}$	$6,83 \times 10^7 \pm 4,75 \times 10^7$	$1,88 \times 10^8 \pm 3,25 \times 10^7$	0,00	0,00
RB6	$3,88 \times 10^7 \pm 1,13 \times 10^7$	$2,79 \times 10^7 \pm 1,46 \times 10^7$	$2,80 \times 10^5 \pm 2,20 \times 10^5$	$8,13 \times 10^{-3} \pm 3,63 \times 10^{-3}$	$2,35 \times 10^8 \pm 1,84 \times 10^8$	$3,58 \times 10^7 \pm 2,34 \times 10^7$	0,00	0,00
	Б и о п л е н к а							
RB1	$1,15 \times 10^7 \pm 6,15 \times 10^6$	$1,15 \times 10^7 \pm 1,04 \times 10^6$	$5,13 \times 10^2 \pm 3,63 \times 10^2$	$4,89 \times 10^{-5} \pm 2,06 \times 10^{-5}$	$7,94 \times 10^6 \pm 1,29 \times 10^6$	$3,04 \times 10^7 \pm 2,67 \times 10^7$	0,00	0,00
RB2	$4,07 \times 10^6 \pm 3,81 \times 10^6$	$7,76 \times 10^6 \pm 3,56 \times 10^6$	$7,38 \times 10^3 \pm 6,88 \times 10^3$	$1,60 \times 10^{-3} \pm 3,42 \times 10^{-4}$	$3,43 \times 10^7 \pm 2,22 \times 10^7$	$3,03 \times 10^7 \pm 2,62 \times 10^7$	0,00	0,00
RB3	$5,32 \times 10^6 \pm 3,93 \times 10^6$	$4,78 \times 10^6 \pm 8,75 \times 10^5$	$1,13 \times 10^3 \pm 7,75 \times 10^2$	$2,13 \times 10^{-4} \pm 1,23 \times 10^{-4}$	$4,70 \times 10^6 \pm 2,08 \times 10^6$	$5,25 \times 10^6 \pm 2,00 \times 10^6$	0,00	0,00
RB4	$8,16 \times 10^6 \pm 3,44 \times 10^6$	$3,96 \times 10^7 \pm 7,56 \times 10^6$	$2,49 \times 10^4 \pm 1,91 \times 10^4$	$5,58 \times 10^{-4} \pm 3,76 \times 10^{-4}$	$1,48 \times 10^6 \pm 3,25 \times 10^5$	$2,83 \times 10^7 \pm 2,50 \times 10^7$	0,00	0,00
RB5	$7,43 \times 10^6 \pm 3,07 \times 10^6$	$2,02 \times 10^7 \pm 1,73 \times 10^7$	$2,50 \times 10^1 \pm 2,50 \times 10^1$	$8,47 \times 10^{-6} \pm 8,47 \times 10^{-6}$	$1,55 \times 10^6 \pm 3,00 \times 10^5$	$2,96 \times 10^6 \pm 1,16 \times 10^6$	0,00	0,00
RB6	$7,82 \times 10^6 \pm 3,20 \times 10^6$	$2,01 \times 10^7 \pm 1,75 \times 10^7$	$1,10 \times 10^3 \pm 1,00 \times 10^2$	$2,40 \times 10^{-4} \pm 2,13 \times 10^{-4}$	$9,38 \times 10^6 \pm 3,63 \times 10^6$	$7,74 \times 10^6 \pm 5,26 \times 10^6$	0,00	0,00

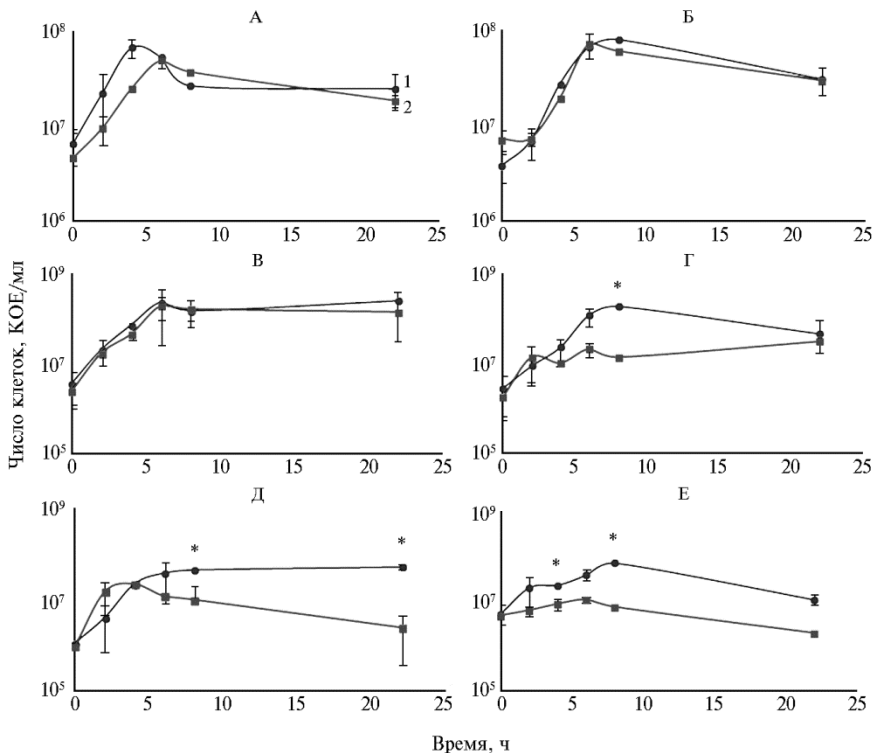
Примечание. D — контрольный донор, KD — киллерный донор, R — реципиент, T — трансконогянт, Y — частота конъюгативного переноса.

пленке составила  $r_p = 0,905$  ( $p = 0,05$ ). Во всех вариантах конъюгации с киллерным донором *E. coli* ЖР и штаммами-реципиентами трансконъюганты не были детектированы. То есть клетки реципиентов, получившие *colE7* ген посредством конъюгативного переноса, экспрессировали его и были лизированы из-за ДНКазной активности колицина.

Дополнительно через 24 ч в смешанных культурах определяли биомассу биопленки. Для разных штаммов величина ОД варьировала от 0,100 до 0,187 ед. и составила в среднем  $0,144 \pm 0,007$  ед. Была выявлена обратная умеренная связь между биомассой биопленки и частотой конъюгации в прикрепленной модели ( $r_p = -0,630$ ,  $p = 0,05$ ).

Необходимо отметить, что число клеток контрольного и киллерного доноров в конъюгативной смеси через 24 ч в планктоне составило в среднем  $2,22 \times 10^7 \pm 2,03 \times 10^7$  и  $1,02 \times 10^8 \pm 7,69 \times 10^7$  КОЕ/мл, в биопленке —  $7,38 \times 10^6 \pm 2,33 \times 10^6$  и  $9,89 \times 10^6 \pm 1,13 \times 10^7$  КОЕ/мл, что может свидетельствовать о высокой конкурентоспособности доноров в полимикробных сообществах. Это предположение было проверено в опытах при совместном выращивании киллерного донора и штаммов АРЕС в смешанной культуре.

Кривые роста культур киллерного донора *E. coli* ЖР и трех штаммов АРЕС — RB2 (не продуцирующий бактериоцины и нечувствительный к ColE7), RB3 (продуцирующий бактериоцины и чувствительный к ColE7) и RB4 (продуцирующий бактериоцины и нечувствительный к ColE7) на богатой (LB) и бедной (M9) средах представлены на рисунке 2.



**Рис. 2.** Рост клеток штаммов АРЕС (avian pathogenic *Escherichia coli*) в смешанных культурах с *E. coli* ЖР на богатой (LB) среде (слева) и минимальной (M9) среде (справа): 1 — реципиент (АРЕС), 2 — киллерный донор (ЖР); А, Б — штамм RB2, В, Г — штамм RB3, Д, Е — штамм RB4. Звездочками (\*) отмечены статистически значимые различия ( $p \leq 0,05$ ) между ростом реципиента и киллерного донора в соответствующие периоды времени.

Конкурентная динамика между *E. coli* ЖР и штаммами АРЕС в

условиях богатой среды (см. рис. 2, А, В, Д) существенно различалась. В отсутствие антагонизма между штаммами (реципиент RB2) сразу же после инокуляции увеличивалась численность клеток обеих культур, а некоторое изменение в соотношении бактерий конкурирующих штаммов было обусловлено, скорее всего, преимуществом в скорости роста природного штамма RB2. Через 5 ч совместного роста число клеток *E. coli* ŽP было стабильным. Отмечалась тенденция к снижению числа бактерий *E. coli* RB2 за счет их лизиса в результате конъюгативного переноса плазмиды, который был достаточно эффективным (частота  $2,46 \times 10^{-2} \pm 3,02 \times 10^{-2}$ ). При совместном росте *E. coli* ŽP и RB4 число клеток *E. coli* ŽP к достижению стационарной фазы, напротив, снижалось. По-видимому, на этом этапе проявлялась антагонистическая активность штамма APES, обусловленная синтезом бактериоцина, который индуцируется увеличением плотности культуры, начиная с конца логарифмической фазы роста. Учитывая, что бактерии *E. coli* RB4 нечувствительны к ColE7, а частота конъюгации была невысока, соотношение клеток через 24 ч в этой паре вполне объяснимо. Интересно, что в смешанной культуре *E. coli* ŽP и RB3, в которой RB3 также продуцирует бактериоцины, но чувствителен к ColE7, антагонистической активности между штаммами не наблюдалось.

На среде M9 (см. рис. 2, Б, Г, Е) соотношение между *E. coli* ŽP и RB2 не менялось, в то время как APES, продуцирующие колицины (RB3 и RB4), подавляли рост киллерного донора в конце логарифмической—начале стационарной фазы. Однако отсутствие достоверных различий между ассоциантами в конце культивирования, по-видимому, может быть связано с неэффективной конъюгацией со стороны *E. coli* ŽP и низкой интенсивностью синтеза колицинов реципиентами (RB3 и RB4) при росте на бедной культуральной среде.

В предварительных исследованиях по конъюгативному переносу плазмиды *in vivo* в кишечнике крыс и перепелов не были обнаружены бактерии *E. coli*, устойчивые к ампициллину, хлорамфениколу и гентамицину. На крысиной модели в I группе на 3-и сут после введения штаммов число жизнеспособных клеток контрольного донора и реципиента в среднем составило соответственно  $3,50 \times 10^4 \pm 2,15 \times 10^3$  и  $3,54 \times 10^3 \pm 1,23 \times 10^3$  КОЕ/г (табл. 3). Трансконъюгантные *E. coli* с фенотипом  $\text{Amp}^r \text{Cm}^r$  были детектированы на 3-и сут после введения реципиента, в среднем их число составило  $2,15 \times 10^2 \pm 1,75 \times 10^2$  КОЕ/г, частота конъюгации —  $6,07 \times 10^{-2} \pm 5,58 \times 10^{-2}$ . В этой группе наблюдался рост числа клеток как донора, так и реципиента в течение всего времени эксперимента. Во II группе число жизнеспособных клеток киллерного донора и реципиента на 3-и сут составляло соответственно  $1,50 \times 10^4 \pm 1,25 \times 10^3$  и  $2,19 \times 10^3 \pm 1,25 \times 10^3$  КОЕ/г. В последующие сроки количество клеток *E. coli* ŽP увеличивалось до  $10^7$  КОЕ/г, в то время как число клеток реципиентов после первого введения возросло незначительно. Трансконъюганты в этой группе не обнаружили ни в один из контрольных сроков. В группе животных, которые не получали донорные штаммы, во все сроки бактерии *E. coli*, устойчивые к ампициллину, хлорамфениколу и гентамицину, не были детектированы.

Учитывая результаты колонизации кишечника крыс донорными штаммами в предварительном эксперименте, в модели с маньчжурскими перепелами введение реципиента и оценку конъюгативного переноса проводили на более ранних сроках. Уже через 2 сут после применения бактериальной суспензии численность клеток донорного и киллерного штаммов *E. coli* в кишечнике птицы составила соответственно  $2,70 \times 10^6 \pm 2,01 \times 10^5$  и  $8,12 \times 10^5 \pm 2,22 \times 10^5$  КОЕ/г. Частота конъюгативного переноса в I группе



**3. Число клеток доноров, реципиентов, транскоњуогантов (КОЕ/г) и частота конъюгации в условиях кишечного тракта крыс линии Wistar и маньчжурских перепелов в экспериментах по конъюгативному переносу плазмиды рОХ38 в штаммы АРЕС (avian pathogenic *Escherichia coli*) ( $M \pm SEM$ )**

Срок, сут	I группа, <i>E. coli</i> N4i (контрольный донор)				II группа, <i>E. coli</i> ŽP (киллерный донор)			
	D	R	T	Y	KD	R	T	Y
	Крысы							
3-и	$3,50 \times 10^4 \pm 2,15 \times 10^3$	н.о	н.о	н.о	$1,50 \times 10^4 \pm 1,25 \times 10^3$	н.о	н.о	н.о
6-е	$7,21 \times 10^5 \pm 5,29 \times 10^4$	н.о	н.о	н.о	$2,34 \times 10^5 \pm 1,74 \times 10^5$ a	н.о	н.о	н.о
10-е	$2,96 \times 10^6 \pm 2,01 \times 10^6$ a	$3,54 \times 10^3 \pm 1,23 \times 10^3$	$2,15 \times 10^2 \pm 1,75 \times 10^2$	$6,07 \times 10^{-2} \pm 5,58 \times 10^{-2}$	$5,97 \times 10^5 \pm 2,58 \times 10^5$ a	$2,19 \times 10^3 \pm 1,25 \times 10^3$	0,00	0,00
14-е	$1,26 \times 10^7 \pm 8,64 \times 10^6$ a	$5,21 \times 10^5 \pm 2,13 \times 10^4$	$4,11 \times 10^4 \pm 4,00 \times 10^3$	$7,87 \times 10^{-2} \pm 8,32 \times 10^{-3}$	$5,64 \times 10^7 \pm 8,96 \times 10^6$ a	$4,22 \times 10^4 \pm 2,36 \times 10^4$	0,00	0,00
21-е	$7,25 \times 10^7 \pm 2,35 \times 10^7$ a	$8,69 \times 10^6 \pm 5,55 \times 10^6$ a	$6,15 \times 10^4 \pm 1,02 \times 10^3$	$7,08 \times 10^{-3} \pm 9,64 \times 10^{-4}$	$2,23 \times 10^7 \pm 1,00 \times 10^7$ a	$5,91 \times 10^4 \pm 4,98 \times 10^3$ b	0,00	0,00
	Перепела							
1-е	$8,00 \times 10^3 \pm 5,21 \times 10^3$	н.о	н.о	н.о	$5,04 \times 10^4 \pm 1,22 \times 10^4$	н.о	н.о	н.о
2-е	$2,70 \times 10^6 \pm 2,01 \times 10^5$ a	$5,00 \times 10^5 \pm 4,55 \times 10^5$	$5,00 \times 10^3 \pm 1,12 \times 10^3$	$1,00 \times 10^{-2} \pm 1,12 \times 10^{-1}$	$8,12 \times 10^5 \pm 2,22 \times 10^5$	$4,68 \times 10^4 \pm 2,25 \times 10^4$	0,00	0,00
3-и	$4,45 \times 10^6 \pm 3,05 \times 10^6$ a	$3,05 \times 10^6 \pm 2,41 \times 10^5$	$1,05 \times 10^4 \pm 1,11 \times 10^4$	$3,44 \times 10^{-3} \pm 2,46 \times 10^{-3}$	$1,74 \times 10^6 \pm 1,96 \times 10^6$ a	$7,39 \times 10^5 \pm 5,57 \times 10^5$	0,00	0,00
6-е	$6,42 \times 10^7 \pm 6,16 \times 10^7$ a	$9,12 \times 10^6 \pm 7,15 \times 10^6$ a	$4,18 \times 10^5 \pm 4,00 \times 10^5$	$4,58 \times 10^{-2} \pm 2,12 \times 10^{-1}$	$2,57 \times 10^7 \pm 3,01 \times 10^7$ a	$8,29 \times 10^5 \pm 5,55 \times 10^5$ b	0,00	0,00

Примечание. D — контрольный донор, KD — киллерный донор, R — реципиент, T — транскоњуогант, Y — частота конъюгативного переноса, н.о. — не определяли.

<sup>a</sup> Различия с показателями на начало эксперимента статистически значимы при  $p \leq 0,05$  (D — по группам относительно соответственно 3-х и 1-х сут, R — относительно 10-х и 2-х сут, KD — относительно 3-х и 1-х сут).

<sup>b</sup> Различия с показателями в группе с контрольным донором статистически значимы при  $p \leq 0,05$ .

(контрольный донор) оставалась равной  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  в течение 6 сут наблюдения. Аналогично эксперименту с крысиной моделью, трансконъюганты во II группе (киллерный донор) не были обнаружены ни в один из сроков. В контроле бактерии *E. coli*, устойчивые к ампициллину, хлорамфениколу и гентамицину, обнаружены не были.

Создание новых методов и средств специфической профилактики и/или терапии бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных активно осуществляется в России и за рубежом (31). Поддержание эффективного симбиоза между организмом птицы и кишечной микробиотой — необходимый компонент успешной кормовой стратегии и сохранения поголовья. Разрабатываются высокоэффективные пробиотические препараты, способные контролировать размножение возбудителей эшерихиозов, сальмонеллезов, кампилобактериозов и других инфекций в кишечнике птицы. Представлены доказательства того, что бактериоцины могут заменить антибиотики в сельском хозяйстве.

Поиск микроорганизмов — продуцентов бактериоцинов, которые можно использовать в качестве пробиотиков, ведется исследователями постоянно. М.А.С. Torshizi с соавт. (32) провели скрининг молочнокислых бактерий, выделенных из образцов кишечника цыплят, и обнаружили два изолята (*Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus rhamnosus*), способных ингибировать рост эшерихий *in vitro*. S.T. Ogunbanwo с соавт. (33) изучили потенциальную терапевтическую эффективность бактериоциногенного штамма *Lactobacillus plantarum* при экспериментальной инфекции *E. coli* у цыплят-бройлеров. Штамм *E. coli* S5/98, продуцирующий микроцин В 5/98 с широким спектром антагонистической активности против бактерий родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, выделенный из фекалий взрослой свиньи, уже используют для производства пробиотика микроцикола в жидкой и сухой форме (34). Испытание микроцикола при выращивании цыплят-бройлеров показало, что препарат представляет собой эффективное средство регуляции кишечной микрофлоры, повышения неспецифической резистентности, сохранности и продуктивности птицы, а также улучшения качества мяса (35). Колицины, класс бактериоцинов, продуцируемых *E. coli* и действующих против представителей близкородственных таксонов, были исследованы в качестве возможной альтернативы антибиотикам: колицин E1 ингибировал рост штаммов энтеропатогенной *E. coli* (ЕТЕС) (36), а его добавление в рацион животных снижало частоту и тяжесть экспериментальной диареи, вызванной ЕТЕС (37). Эти результаты показывают, что использование бактерий-продуцентов или чистых бактериоцинов при выращивании животных может положительно влиять на безопасность продуктов животноводства и птицеводства — основного источника диареегенных штаммов *E. coli*, вызывающих эшерихиозы и токсикоинфекции у человека.

Считается, что биопрепараты медицинского и ветеринарного назначения на основе рекомбинантных микроорганизмов с доказанной безопасностью можно направленно и эффективно использовать для лечения и профилактики разнообразных заболеваний (16). На сегодняшний день обосновано применение комбинированных пробиотических препаратов, сочетающих несколько культур с различными свойствами или искусственно сконструированных штаммов с множественной продукцией бактериоцинов. Основу для разработки новых пробиотических препаратов составляют представители естественной желудочно-кишечной микробиоты, такие как молочнокислые бактерии (*Lactobacillus* и *Bifidobacterium*) и эшерихи-

хии, например *E. coli* Nissle 1917 (38). Будучи комменсальными микроорганизмами, они обычно оказывают терапевтический эффект сами по себе и выступают отличным материалом для инженерной синтетической биологии (39, 40). На основе штамма *E. coli* M17 и природного продуцента *E. coli* S5/98 с использованием векторов pColar и pPAL3 созданы рекомбинантный штамм *E. coli* M17 (pPAL4), продуцирующий микроцин В и колицин E1, и штамм *E. coli* M17 (pPAL5), синтезирующий микроцин, но устойчивый к колицину E1 (35). Предложен пробиотик ромакол на основе генно-инженерного штамма *E. coli* M17 (p74), образующего микроцин C51 (21).

Штамм *E. coli* ŽР перспективен в качестве основы пробиотического препарата за счет возможности воздействия на устойчивые к антибиотикам и бактериоцинам энтеробактерии, циркулирующие в условиях птицеводческих и животноводческих комплексов. Введение клеток *E. coli* ŽР увеличит общее содержание комменсальных эшерихий в кишечнике животных, подавляя при этом развитие патогенных представителей этого вида без заметного влияния на молочнокислую и бифидофлору. Эффективность штамма определяется альтернативной системой доставки колицина, что обеспечивает его высокую конкурентоспособность в различных экологических нишах, где могут присутствовать, в том числе, и продуценты бактериоцинов.

Таким образом, в смешанных культурах итог взаимодействия между штаммами *Escherichia coli* ŽР и АРЕС (avian pathogenic *E. coli*) обусловлен не только скоростью роста культур и чувствительностью к бактериоцинам, но и конъюгативным переносом плазмид. Совокупность этих факторов будет определять конкурентную динамику нового пробиотического штамма *E. coli* ŽР и гетерогенных АРЕС в условиях желудочно-кишечного тракта птицы. Эксперимент *in vivo* показал, что штамм *E. coli* ŽР способен эффективно заселять кишечник крыс и маньчжурских перепелов и сохраняться на протяжении длительного времени. Конъюгативный перенос плазмиды от контрольного донора в условиях кишечного тракта происходил с достаточно высокой частотой, в то время как в группе с киллерным донором трансконъюганты отсутствовали. Сниженное число клеток реципиентов во второй группе также доказывает эффективность действия изучаемого штамма на патогенные формы *E. coli*. Использование конъюгативного механизма при создании нового пробиотического средства в птицеводстве соответствует мировым тенденциям. В полной мере раскрыть биотехнологический потенциал генно-модифицированного штамма *E. coli* ŽР, в том числе его действие на зоотехнические показатели птицы, помогут дополнительные исследования. В частности, представляется важным изучение его эффективности при лечении и профилактике эшерихиозов у животных и оценка терапевтического и противоэпидемического потенциала.

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов  
УрО РАН — филиал Пермского федерального  
исследовательского центра УрО РАН,  
614000 Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13,  
e-mail: info@iegm.ru, mar@iegm.ru ✉, i.maslennikova1974@gmail.com,  
gizatullina.julia@yandex.ru;

<sup>2</sup>Department of Biology, Biotechnical Faculty,  
University of Ljubljana,

Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia,  
e-mail: biologija@bf.uni-lj.si, darja.zgur@bf.uni-lj.si,  
marjanca.starcic.erjavec@bf.uni-lj.si

Поступила в редакцию  
12 января 2020 года

A PROBIOTIC BASED ON THE *Escherichia coli* ŽP STRAIN.  
I. EFFICIENCY ASSESSMENT OF THE CONJUGATIVE TRANSFER  
OF THE COLICIN E7 ACTIVITY GENE INTO AVIAN PATHOGENIC  
*E. coli* STRAINS in vitro AND in vivo

M.V. Kuznetsova<sup>1</sup>, I.L. Maslennikova<sup>1</sup>, J.S. Gizatullina<sup>1</sup>, D. Žgur Bertok<sup>2</sup>,  
M. Starčič Erjavec<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of Ural Branch RAS, 13, ul. Goleva, Perm, 614081 Russia, e-mail info@iegm.ru, mar@iegm.ru (✉ corresponding author), i.maslennikova1974@gmail.com, gizatullina.julia@yandex.ru;

<sup>2</sup>Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia, e-mail biologija@bf.uni-lj.si, darja.zgur@bf.uni-lj.si, marjanca.staric.erjavec@bf.uni-lj.si

ORCID:

Kuznetsova M.V. orcid.org/0000-0003-2448-4823

Žgur Bertok D. orcid.org/0000-0003-4166-552X

Maslennikova I.L. orcid.org/0000-0002-2776-8023

Starčič Erjavec M. orcid.org/0000-0003-0200-573X

Gizatullina J.S. orcid.org/0000-0001-9625-1151

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Government of the Perm Krai within the framework of the scientific project No. C-26/792, and by Slovenian Research Agency (ARRS), grant Nos. P1-0198 and BI-RU/16-18-047

Received January 12, 2020

doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.364eng

### Abstract

The protection of farm animals against infectious diseases is a priority in veterinary medicine. The wide spread of pathogenic and opportunistic bacteria resistant to antibiotics on poultry farms requires the development of modern methods to maintain the health of birds in industrial production. A promising direction to improve measures to prevent and limit the spread of pathogens resistant to antimicrobial agents is the use of targeted bacterial drugs — probiotics. Veterinary probiotics based on genetically modified microorganisms can be used for the treatment and prophylaxis of infectious diseases in farm animals. We demonstrated the antagonistic effect of the genetically modified *Escherichia coli* ŽP strain against agents of avian colibacillosis, the avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in both in vitro and in vivo models. The *colE7* gene (colicin E7 synthesis gene) carried on a conjugative plasmid was efficiently transferred by conjugation in conditions of planktonic and biofilm growth in vitro. The *E. coli* ŽP strain was shown to actively colonize the intestine of rats and quails and to contribute to beneficial effects of the microbiota. Our aim was to evaluate the competitive ability of the *E. coli* ŽP strain as well as the efficiency of killing APEC based on the conjugative transfer of the *colE7* gene, encoding a DNase, in vitro and in vivo. We used the ColE7-mediated kill—anti-kill system based on the Nissle 1917 probiotic strain, the genetically modified *E. coli* ŽP strain (killer donor) carrying the *colE7* gene on the conjugative plasmid pOX38a, as well as the *im-mE7* gene (colicin E7 immunity gene) on the chromosome. As control, the *E. coli* N4i strain without *colE7* gene on the conjugative plasmid pOX38 (control donor) was used. Six APEC strains with resistance to ampicillin isolated from organs of broilers with colibacillosis were used as recipients in performed conjugation assays. The phylogenetic group of used APEC strains was detected with quadruplex PCR. The conjugation transfer was conducted in Luria-Bertani (LB) medium in immunological polystyrene 96-wells flat bottom plates in plankton and in biofilm culture. The experiments with rats (Wistar line) and Manchurian quail (*Coturnix coturnix*) were conducted in the vivarium of the Wagner Perm State Medical University. The competitive ability of *E. coli* ŽP strain was confirmed in co-cultivation assays with APEC strains, including bacteriocin producers, in various models. Conjugative *colE7* gene transfer to APEC was detected in vitro in plankton and in biofilm: in experiments with the control donor strain *E. coli* N4i the conjugation frequency varied from  $10^{-6}$  to  $10^{-2}$ . In vivo, it was shown that *E. coli* ŽP strain was able to effectively colonize the rat (line Wistar) and Manchurian quail (*Coturnix coturnix*) intestine and persist there at least for a month. Introduced *E. coli* ŽP cells increased the total amount of commensal *Escherichia* in the intestine of the animals and reduced the growth of the pathogenic microbes without affecting the lactic acid bacteria. The transfer ability of the conjugative plasmid pOX38 in the intestinal tract of both animal species was demonstrated. The conjugation in the intestinal tract occurred with a high frequency, on average  $10^{-2}$ . No transconjugants were detected in both in vitro and in vivo experiments with the *E. coli* ŽP strain harboring the conjugative plasmid pOX38a; the recipient cells that received the *colE7* gene via the conjugative transfer expressed it and were lysed due to the colicin DNase activity. This was reflected in the number of APEC recipient cells, it was namely reduced in the assays with the ŽP strain. The

results obtained indicated that the *E. coli* ŽP strain was able to colonize the intestine of animals and had antibacterial activity against enteropathogens due to the conjugative mechanism of colicin gene transfer. As the ŽP strain was also effective on APEC cells that were resistant and tolerant to bacteriocins, it has the potential to become the basis for a highly effective new generation of probiotics.

Keywords: colicins, ColE7, conjugative transfer, kill—anti-kill system, antibiotic alternative, probiotics, avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), animal models.

## REFERENCES

1. Fisinin V.I. *Materialy XIX Mezhdunarodnoi konferentsii «Mirovye i rossiiskie trendy razvitiya pitsevodstva: realii i vyzovy budushchego»* [Proc. XIX Int. Conf. «World and Russian poultry development trends: realities and future challenges»]. Sergiev Posad, 2018: 9-48 (in Russ.).
2. Nefedova V.N., Maiorova S.V. *Ekonomika i Biznes: teoriya i praktika*, 2017, 8: 60-64 (in Russ.).
3. Mezentsev S.V., Telegin N.G. *BIO*, 2004, 10: 5-8 (in Russ.).
4. Miles T.D., McLaughlin W., Brown P.D. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*, 2006, 2(7): 1-9 (doi: 10.1186/1746-6148-2-7).
5. Koga V.L., Rodrigues G.R., Scandorieiro S., Vespero E.C., Oba A., de Brito B.G., de Brito K.C.T., Nakazato G., Kobayashi R.K.T. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Parana, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2015, 12(6): 479-485 (doi: 10.1089/fpd.2014.1888).
6. Mora A., Viso S., Lypez C., Alonso M.P., Garcia-Garrote F., Dabhi G., Mamani R., Herrera A., Marzoa J., Blanco M., Blanco J.E., Moulin-Schouleur M., Schouleur C., Blanco J. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3-4): 506-612 (doi: 10.1016/j.vetmic.2013.08.007).
7. *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2014.
8. *Proekt Rasporyazheniya Pravitel'stva Rossiiskoi Federatsii «Ob utverzhdenii Strategii preduprezhdeniya i preodoleniya ustoichivosti mikroorganizmov i vrednykh organizmov rastenii k lekarstvennym preparatam, khimicheskim i biologicheskim sredstvam na period do 2030 goda i dal'neishuyu perspektivu»* (podgotovlen Minzdravom Rossii 08.06.2017) [Draft Order of the Government of the Russian Federation «On approval of the Strategy for preventing and overcoming the resistance of microorganisms and pests of plants to drugs, chemical and biological agents for the period up to 2030 and beyond» (prepared by the Ministry of Health of Russia on 08.06.2017)] (in Russ.).
9. Jadhav K., Sharma K.S., Katoch S., Sharma V.K., Mane B.G. Probiotics in broiler poultry feeds: a review. *International Journal of Animal and Veterinary Science*, 2015, 2: 4-16.
10. Bidarkar V.K., Swain P.S., Ray S., Dominic G. Probiotics: potential alternative to antibiotics in ruminant feeding. *Trends in Veterinary and Animal Sciences*, 2014, 1: 1-4.
11. Parker R.B. Probiotics the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, 1974, 29: 4-8.
12. Kavitha R.B., Desai J., Deepika Reddy A.R., Radhakrishna P.M. Effect of probiotics supplementation on the performance of broilers. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 2007, 24(3): 142-146.
13. Rozhdestvenskaya T.N., Yakovlev S.S., Kononenko E.V. *Zhivotnovodstvo*, 2012, 1(1): 54-56 (in Russ.).
14. Sushkova V.I., Ustyuzhaninova L.V. *Kormoproizvodstvo*, 2017, 3: 34-40 (in Russ.).
15. Higgins J.P., Higgins S.E., Vicente J.L., Wolfenden A.D., Tellez G., Hargis B.M. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on *Salmonella* in neonatal broilers. *Poultry Science*, 2007, 86(8): 1662-1666 (doi: 10.1093/ps/86.8.1662).
16. Starovoitova S.A., Skrotskaya O.I. Probiotiki na osnove transgennykh mikroorganizmov. *Biotechnologia Acta*, 2013, 6(1): 34-45 (in Russ.).
17. Lebedeva I.A., Prokkoeva Zh.A., Shchetkina S.V. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Biotekhnologiya i obshchestvo v XXI veke»* [Proc. Int. Conf. «Biotechnology and society in the 21st century»]. Barnaul, 2015: 370-374 (in Russ.).
18. Crittenden R., Bird A.R., Gopal P., Henriksson A., Lee Y.K., Playne M.J. Probiotic research in Australia, New Zealand and the Asia-Pacific region. *Current Pharmaceutical Design*, 2005, 11(1): 37-53 (doi: 10.2174/1381612053382304).
19. Ushakova N.A., Nekrasov R.V., Pravdin V.G., Kravtsova L.Z., Bobrovskaya O.I., Pavlov D.S. *Fundamental'nye issledovaniya*, 2012, 1: 184-192 (in Russ.).
20. Livshits V.A., Chesnokova V.L., Aleshin V.V., Sokurenko E.V., Dalin M.V., Kravtsov E.G., Bykov V.A. *Shتامm bakterii Escherichia coli m17 fimh::kan/p colap, ispol'zuemyi dlya polucheniya probioticheskogo preparata. (RF) MPK<sup>7</sup> C 12 N 1/21, A 61 K 35/74. № 2144954. Zayavl.*

- 15.01.98. Opubl. 27.01.2000 [The bacterial strain *Escherichia coli* m17 fimh::kan/p colap used to obtain the probiotic preparation. (RF) MPK<sup>7</sup> C 12 N 1/21, A 61 K 35/74. № 2144954. Appl. 15.01.98. Publ. 27.01.2000] (in Russ.).
21. Sokolova N.A., Khmel' I.A., Shegidevich E.A. *Veterinariya*, 2001, 11: 46-49 (in Russ.).
  22. Budić M., Rijavec M., Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28769 (doi: 10.1371/journal.pone.0028769).
  23. Filutowicz M., Burgess R., Gamelli R.L., Heinemann J.A., Kurenbach B., Rakowski S.A., Shankar R. Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid*, 2008, 60(1): 38-44 (doi: 10.1016/j.plasmid.2008.03.004).
  24. Maslennikova I.L., Kuznetsova M.V., Toplak N., Nekrasova I.V., Žgur-Bertok D., Starčić Erjavec M. Estimation of the bacteriocin ColE7 conjugation-based «kill»—«anti-kill» antimicrobial system by real-time PCR, fluorescence staining and bioluminescence assays. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 67(1): 47-53 (doi: 10.1111/lam.12884).
  25. Starčić Erjavec M., Petkovšek Z., Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Žgur-Bertok D. Strain ŽP — the first bacterial conjugation-based «kill»—«anti-kill» antimicrobial system. *Plasmid*, 2015, 82: 28-34 (doi: 10.1016/j.plasmid.2015.10.001).
  26. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(24): 6823-6831 (doi: 10.1093/nar/19.24.6823).
  27. Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(1): 58-61 (doi: 10.1111/1758-2229.12019).
  28. Guglielmetti E., Korhonen J.M., Heikkinen J., Morelli L., von Wright A. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 293(1): 28-34 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01512.x).
  29. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilm. *Current Protocols in Microbiology*, 2005, 00(1): 1B.1.1-1B.1.18 (doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00).
  30. *GOST 34088-2017. Rukovodstvo po sodержaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila sodержaniya i ukhoda za sel'skokhozyaistvennymi zhivotnymi* [GOST 34088-2017. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for keeping and caring for farm animals]. Moscow, 2018 (in Russ.).
  31. Gillor O., Kirkup B.C., Riley M.A. Colicins and microcins: the next generation of antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, 2004, 54: 129-146 (doi: 10.1016/S0065-2164(04)54005-4).
  32. Karimi Torshizi M.A., Rahimi S.H., Mojgani N., Esmailkhanian S., Grimes J.L. Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 2008, 21(10): 1495-1500 (doi: 10.5713/ajas.2008.80081).
  33. Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., Onilude A.A. Influence of bacteriocin in the control of *Escherichia coli* infection of broiler chickens in Nigeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(1): 51-56 (doi: 10.1023/B:WIBI.0000013311.43842.74).
  34. Tarakanov B.V. *Shtamm bakterii Escherichia coli, ispol'zuemyi dlya proizvodstva probiotika mikrotsikola V5/98. (RF) MPK C 12 N 1/20, A 61 K 35/74, C 12 R 1/19. № 2268297. Zayavl. 29.12.03. Opubl. 20.01.06. Byull. № 02* [The bacterial strain *Escherichia coli* used to produce the probiotic microcycol B5/98. (RF) MPK C 12 N 1/20, A 61 K 35/74, C 12 R 1/19. № 2268297. Appl. 29.12.03. Publ. 20.01.06. Bull. № 02] (in Russ.).
  35. Tarakanov B.V., Aleshin V.V., Nikolicheva T.A., Polyakova L.L., Yakovleva A.A., Nikulin V.N., Palagina T.E. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2008, 1: 20-36 (in Russ.).
  36. Stahl C.H., Callaway T.R., Lincoln L.M., Lonergan S.M., Genovese K.J. Inhibitory activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for postweaning diarrhea and edema disease in swine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(8): 3119-3121 (doi: 10.1128/AAC.48.8.3119-3121.2004).
  37. Cutler S.A., Lonergan S.M., Cornick N., Johnson A.K., Stahl C.H. Dietary inclusion of colicin E1 is effective in preventing postweaning diarrhea caused by F18-positive *Escherichia coli* in pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(11): 3830-3835 (doi: 10.1128/AAC.00360-07).
  38. Sonnenborn U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 — from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(19): fnw212 (doi: 10.1093/femsle/fnw212).
  39. Chua K.J., Kwok W.C., Aggarwal N., Sun T., Chang M.W. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 40: 8-16 (doi: 10.1016/j.cbpa.2017.04.011).
  40. Álvarez B., Fernández L.A. Sustainable therapies by engineered bacteria. *Microbiology and Biotechnology*, 2017, 10(5): 1057-1061 (doi: 10.1111/1751-7915.12778).