

Индикация биопленок и некультивируемых микроорганизмов при мониторинге биологической безопасности пищевого сырья

Ленченко Екатерина Михайловна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11

E-mail: lenchenko.ekaterina@yandex.ru

Сысоева Наталья Юрьевна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11

E-mail: 864365@mail.ru

Блюменкранц Дмитрий Алексеевич

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11

E-mail: blumenkrants@inbox.ru

Актуальность исследования и наличие пробелов в существующем знании на тему. Мониторинговые исследования биологической безопасности пищевого сырья по микробиологическим показателям – актуальная проблема, в связи с увеличением числа пищевых инфекций во всем мире.

Цель работы – изучить особенности формирования биопленок и некультивируемых микроорганизмов при различных условиях культивирования

Методы. Морфометрические и денситометрические показатели биопленок и некультивируемых микроорганизмов исследовали при различных условиях культивирования. Для изучения роста и развития популяций микроорганизмов использовали среды, содержащие ростовые факторы для репарации клеточной стенки и реверсии L-форм микроорганизмов.

Результаты и их обсуждение. При микробиологическом контроле критических точек технологии животноводства и пищевых производств изучены видовой состав и этиологическая значимость факторов вирулентности штаммов, продуцирующих адгезивные антигены, бактериоцины, гемолизины, токсины, β -лактамазы расширенного спектра, обуславливающие тенденцию роста множественной лекарственной устойчивости. Изучены морфофункциональные признаки биопленок, представляющих собой сообщества микроорганизмов, секретирующих полимерный матрикс и адгезированных к тканям восприимчивых видов животных и абиотическим поверхностям животноводческих помещений и пищевых производств. Установлены прямые коррелятивные зависимости между филаментацией, дисперсией поливидовых биопленок микроорганизмов и развитием дистрофических и некротических процессов в тканях и органах млекопитающих и птиц. Для оптимизации схемы микробиологической диагностики инфекционной патологии апробированы и подобраны эффективные способы детекции гетероморфных биопленок и некультивируемых микроорганизмов. Для предотвращения формирования биопленок патогенных микроорганизмов перспективными являются препараты, снижающие уровень микробиологических показателей первичной контаминации; минимизации адгезивных свойств, а также биоцидов разрушающих межклеточный матрикс.

Выводы. Способность формирования биопленок, вариабельность фенотипических признаков, множественность факторов вирулентности, возникновение устойчивых форм бактерий за счет синтеза экзополисахаридов, значительно снижают эффективность противоэпизоотических и диагностических мероприятий. Разработка ускоренных методов детекции биопленок и дифференциации некультивируемых микроорганизмов позволит научно обосновать и разработать комплекс мероприятий, направленных на предупреждение заболеваний животных и получение безопасных продуктов животноводства, с целью профилактики заболеваний человека.

Ключевые слова: адгезия, матрикс, биоплёнки, бактериоцины, гемолизины, диссеминация, колонизационная резистентность, L-формы, некультивируемые микроорганизмы

Введение

Мониторинговые исследования биологической безопасности пищевого сырья по микробиологическим показателям – актуальная проблема, в связи с увеличением числа зарегистрированных болезней, передаваемых человеку через сырье и продукты животного происхождения. Наблюдается тенденция статистически достоверного возрастания эпидемиологических показателей во всем мире, доля указанных патологий составляла 20,6 % из общего числа 5098 вспышек пищевых инфекций, госпитализация – 4588, летальность – 0,9 (WHO, 2018).

Колонизационная резистентность слизистой оболочки органов дыхательной, пищеварительной, половой системы обеспечивает защиту от формирования биоплёнок патогенов, включая *Yersinia enterocolitica*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.* (Ленченко, 1996; Ленченко, 2014; Sicard et al., 2017; Sushma et al., 2018). Наиболее актуальными и опасными патогенами признаны полирезистентные штаммы микроорганизмов «ESKAPE» – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, способные адаптироваться к действию химиотерапевтических и дезинфицирующих препаратов (Maarten et al., 2018).

При многократных пассажах возбудителей инфекционных болезней через восприимчивый организм млекопитающих и птиц персистенция микроорганизмов сопровождается контаминацией пищевого сырья. В частности, 30,7 % проб мяса были контаминированы бактериями рода *Salmonella*, в том числе *S. typhimurium* – 11,3 %, *S. enteritidis* – 9,4 %, из которых 19 проб говядины (16,5 %); 35 проб свинины (30,4 %); 52 пробы мяса птицы (45,2 %) (Ленченко и соавт., 2017). Выделенные из мяса бройлеров 87 штаммов *S. infantis*, являлись сильными продуцентами биопленок, средний показатель оптической плотности – $0,42 \pm 0,17$ (Pate et al., 2019).

На поверхности оборудования пищевых производств резистентные штаммы *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Enterococcus spp.*, выделенные из пищевого сырья, формировали биоплёнки, положительная корреляционная зависимость ($r=0,94$) установлена между биологическим объемом ($182704,31 - 238200,56 \text{ мкм}^3$) и поверхностным натяжением субстрата (24,58–99,95 %) (Rodríguez-Melcón et al., 2018). Наличие *Listeria monocytogenes* выявлено в 195 пробах мяса птицы:

36 (17,9 %) – в тушах бройлеров на технологическом этапе потрошения; 43 (22,1 %) – на этапе упаковки (Santos et al., 2018). Микроорганизмы способны колонизировать поверхность оборудования на линии переработки мясоперерабатывающих предприятий (*Salmonella spp.* – 88,46 %) и сохранять жизнеспособность благодаря образованию биоплёнок (Nidaullah et al., 2017).

В свете современных данных микроорганизмы составляют около 10,0–15,0 % массы биоплёнок, остальная часть – межклеточный матрикс из воды, экзополисахаридов, протеинов, липидов, нуклеиновых и тейхоевых кислот (Lenchenko et al., 2019; Surgers et al., 2019). Мутации в генах, участвующих в процессе дисперсии, вызывают гиперагрегацию биопленок, гетероморфизм в кластерах с различными проявлениями L-трансформации, переход популяции в «некультивируемое состояние», формированием фенотипической резистентности (Ленченко, 1996; Pakhomov et al., 2012; Ленченко и соавт., 2014).

Снижение интенсивности метаболизма обеспечивается экзополисахаридами биопленок, при реализации активности факторов вирулентности, кодируемыми хромосомными, плазмидными генами и интегрированными в хромосому бактериофагами (Ленченко и соавт., 2014; Андрюков, 2018; Lenchenko et al., 2019). Установлены прямые коррелятивные зависимости между дисперсией биопленок и пролиферацией микроорганизмов в эпителиальный и соединительнотканый слой дермы (Ленченко и соавт., 2014). Положительная корреляционная зависимость наблюдается между продуцированием биопленок и профилем устойчивости к антибактериальным препаратам (Surgers et al., 2019). Множественная продукция β -лактамаз наблюдалась у 21,52 % изолятов, установлено одновременное продуцирование 2 и/или 3 β -лактамаз, устойчивость к β -лактамам антибиотикам достигала 21,94 % – имипенем, 5,49 % – полимиксин (Tankhiwale, Nagar, 2016). Гены расширенного спектра β -лактамаз были выявлены у 93,4 % изолятов, у 100,0 % штаммов обнаруживали два генетических фактора вирулентности (Fangjun et al., 2018).

Способность формирования биопленок, возникновение устойчивых форм бактерий за счет синтеза экзополисахаридов, значительно снижают эффективность химиотерапевтических и дезинфицирующих препаратов.

Для разработки комплекса диагностических и противоэпизоотических мероприятий, направленных на предупреждение заболеваний животных и по-

лучение безопасных продуктов животноводства, приоритетным направлением научных изысканий является разработка ускоренных методов детекции биопленок и некультивируемых микроорганизмов при микробиологическом контроле критических точек технологии животноводства, пищевых и биотехнологических производств, что и определило актуальность темы исследований.

Цель работы – изучить особенности формирования биопленок и некультивируемых микроорганизмов при различных условиях культивирования

Материалы и методы

Материалы

Для исследования колонизационной резистентности кишечника учитывали индекс колонизации – количество микроорганизмов (КОЕ) в 1,0 г исследуемого материала телят породы «Симментальская»; ягнят породы «Агинская»; птиц кросса «Шейвер Уайт». Степень контаминации микроорганизмами проб пищевого сырья и продуктов животного происхождения исследовали, в соответствии с Техническими Регламентами Таможенного Союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции». Микроорганизмы культивировали при 37 °C, 24–72 ч на «*Chromocult Coliform agar*», «*Cetrimide Agar*», «*Yolk-salt agar*», «*HiCrome Candida Agar*» («HIMEDIA», Индия).

Для изучения биопленок и некультивируемых микроорганизмов препараты фиксировали смесью спирт:эфир – 1:1, в течение 10 минут; 4,0 %-ным раствором глутарового альдегида – 30–40 мин, 1,0 % водного раствора осмиевой кислоты – 1–2 мин. Препараты окрашивали 0,1 %-ным раствором генцианвиолета, 0,5 % метиленового синего, 0,5 % трипанового синего, 0,1 % акридинового оранжевого, 0,1 % водным раствором конго-красного, водным раствором кристаллвиолета в разведении 1:2000, по Граму, «*Gram-color-stain set for the Gram staining method*» («БиоВитрум», Россия).

Методика исследования

Оборудование

Стереоскопический микроскоп «Биомед МС–1 Стерео» (Россия, 2016); оптические микроскопы: «Биомед 5» (Россия, 2018), «H604T Trinocular Unico» (США, 2016); микропланшетный фотометрический

анализатор «Immunochem-2100» (США, 2017).

Инструменты

«STATGRAPHICS PLUS» (Statgraphics Technologies); «Advanced Grapher» (Alentum Software).

Методы

Идентификацию микроорганизмов, проводили общепринятыми методами в соответствии с классификационной системой «*Bergey's manual 1984–1989*».

Факторы вирулентности и признаки микроорганизмов, связанные с плазмидой вирулентности, определяли по наличию адгезивных антигенов, бактериоцинов, гемолизинов, токсинов, β -лактамаз. Для изучения взаимодействия микроорганизмов с клетками восприимчивых видов использовали эритроциты птиц и млекопитающих (Ленченко и соавт., 2014).

Культуры микроорганизмов (4 ЕД, McFarland) культивировали при 37 °C, 18–72 ч, а также при воздействии препаратов: «Цефтриаксон», 25,0 мкг/мл (ОАО «Синтез АКО», Россия); «Абактерил», 0,25 % (ООО «Рудез», Россия).

Для исследования роста и развития некультивируемых микроорганизмов в популяциях использовали мембранные фильтры, помещенные на поверхность плотных питательных сред в чашки Петри. Для детекции некультивируемых микроорганизмов использовали среды, содержащие компоненты для репарации клеточной стенки и реверсии L-форм (Ленченко, 1996; Lenchenko et al., 2017; Becerra et al, 2016).

Оптическую плотность определяли по степени связывания кристаллического фиолетового («Himedia», Индия) при длине волны 490 нм, для этого в лунки 96-луночного планшета («Медполимер», Россия) вносили исследуемые образцы и культивировали 37 °C, 48 ч. Затем жидкость удаляли, лунки планшетов трижды промывали 200 мкл фосфатно-солевым раствором (рН 7,3). На каждой стадии промывки планшеты встряхивали в течение 5 мин. Фиксацию производили 150,0 мкл 96,0 % этанола в течение 15 мин, затем лунки подсушивали 37 °C, 20 мин. В лунки вносили 0,5 %-ный раствор красителя, культивировали 37 °C, 5 мин. Содержимое лунок удаляли, трижды промывали 200,0 мкл фосфатно-солевым раствором (рН 7,3), подсушивали. Краситель элюировали из адгезированных клеток 200 мкл 96,0 %-ным этанолом в течение 30 мин. Учитывали показатели: интенсивность формирования биопленки

(Intensive Density – ID): ID $\leq$ 0,1 – микроорганизмы не продуцирующие биоплёнку; ID $\geq$ 0,1–0,2 – слабые продуценты биопленки; ID $\geq$ 0,2–0,3 – умеренные продуценты биопленки; ID $\geq$ 0,3–0,4 – сильные продуценты биопленки (Chandra et al., 2001; Lenchenko et al., 2019; Cadavid et al., 2019).

Для получения репрезентативной информации исследования проводили методом случайного отбора поля зрения достоверной частоты встречаемости – $\geq 90,0\%$ при стереоскопической и оптической микроскопии. Профиль антибиотикограмм учитывали в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 и компьютерной программы «WHONET 5.6».

Анализ данных

Для статистического анализа результатов экспериментов применяли компьютерные программы «STATGRAPHICS PLUS», «Advanced Grapher» (Alentum Software).

Результаты

Микробиологические исследования выявили снижение колонизационной резистентности кишечника телят – индекс колонизации составляет 0,827 %; ягнят – 0,804 %; птиц – 0,806 %. Избыточный рост микроорганизмов в биотопах кишечника сопровождался повышением колонизационного и персистентного потенциала патогенных и потенциально-патогенных микроорганизмов. При уменьшении облигатной микрофлоры установлено преобладание бактерий *Escherichia coli* (42,8 – 54,8 %); *Klebsiella pneumoniae* (24,9 – 35,7 %); *Proteus vulgaris* (12,2 – 25,2 %); *Enterobacter aerogenes* (3,1 – 3,9 %); *Enterobacter cloacae* (3,3 – 5,9 %); *Serratia plymuthica* (1,8 – 2,1 %). Установлена этиологическая

значимость факторов вирулентности бактерий, продуцирующих адгезивные антигены *E.coli* O1 (31,5 %), O2 (23,0 %), O78 (16,7 %), O33:F41 (4,7 %) O111 (10,0 %), O15 (4,9 %), O2:A20 (5,0 %), O41 (4,8 %); α -, β -гемолизины (58,9 – 73,4 %); тиолзависимые гемолизины (37,3 – 45,5 %); термостабильные токсины (58,6 – 61,3 %).

При воздействии колицинов, вызывающих зоны задержки роста тест-штаммов – d–1,0–3,0 мм, интенсивность формирования биоплёнок составила ID=0,123 $\pm$ 0,05 – 0,149 $\pm$ 0,04 (опыт); ID=0,355 $\pm$ 0,07 – 0,364 $\pm$ 0,12 (контроль). Воздействие препаратов «Цефтриаксон» (25,0 мкг/мл) и «Абактерил» (0,25 %) выявило снижение показателей оптической плотности биопленок микроорганизмов, интенсивность формирования биопленок: ID=0,101 $\pm$ 0,04–0,113 $\pm$ 0,15 (опыт); ID=0,458 $\pm$ 0,04 – 0,526 $\pm$ 0,18 (контроль). Бактерицидный эффект к изученным препаратам наблюдался при концентрациях в 2–3 раза превышавших бактериостатический, число жизнеспособных клеток снижалось. Наблюдалось возрастание числа диссоциированных колоний: S-формы, d=2,0 – 5,0 мм; R-формы, d $\geq$ 3,0 мм; M-формы, d=1,5 – 3,0 мм; d-формы (*Dwarf* – карликовые), d=0,2 – 0,5 мм.

Диссоциированные колонии составляли от 1,6 до 87,9 %, интенсивность формирования биоплёнок (ID): S-формы – ID=0,203 $\pm$ 0,04–0,216 $\pm$ 0,12, R-формы – ID=0,107 $\pm$ 0,02–0,121 $\pm$ 0,11. Оптическая плотность образца: D_s – 0,458 $\pm$ 0,04 – 0,526 $\pm$ 0,18, интенсивность формирования биоплёнок – ID $\geq$ 0,3–0,4 – сильные продуценты биопленок; оптическая плотность образца: D_s – 0,321 $\pm$ 0,04 – 0,397 $\pm$ 0,06, интенсивность формирования биоплёнок – ID $\geq$ 0,2–0,3 – умеренные продуценты биопленок. Коррелятивная зависимость ($r=0,96$) установлена между интенсивностью формирования биоплёнок (ID) $\geq$ 0,3–0,4 и индексом адгезии (IA) $\geq$ 4,0–5,0; ID $\geq$ 0,2–0,3 и IA $\geq$ 2,5–3,9, соответственно (См. таблица №1).

Таблица 1

Результаты изучения интенсивности формирования биопленок микроорганизмов

Культуры микроорганизмов	Размеры клеток	Денситометрические показатели (D)			
		Контроль (D _c)	Опыт (D _s)	Интенсивность (ID)	IA
<i>E. coli</i>	(1,4 – 3,8)х(0,5 – 0,8)	0,099 $\pm$ 0,06	0,321 $\pm$ 0,04	$\geq$ 0,2–0,3	3,6 $\pm$ 0,05
<i>P. aeruginosa</i>	(1,5 – 5,0)х(0,5 – 1,4)	0,098 $\pm$ 0,03	0,458 $\pm$ 0,04	$\geq$ 0,3–0,4	4,1 $\pm$ 0,16
<i>S. aureus</i>	(1,5 – 1,6)	0,099 $\pm$ 0,04	0,481 $\pm$ 0,12	$\geq$ 0,3–0,4	4,4 $\pm$ 0,16
<i>C. albicans</i>	(1,5 – 10,0)	0,097 $\pm$ 0,07	0,526 $\pm$ 0,18	$\geq$ 0,3–0,4	4,8 $\pm$ 0,14
<i>C. parapsilosis</i>	(1,5 – 8,0)	0,098 $\pm$ 0,06	0,397 $\pm$ 0,06	$\geq$ 0,2–0,3	3,8 $\pm$ 0,09

Примечание: D – денситометрические показатели; D_c – D контроль; D_s – D исследуемый образец; ID – интенсивность: разность D исследуемого образца (D_s) и контроля (D_c); IA – индекс адгезии: отношение среднего числа микроорганизмов, прикрепившихся к поверхности эритроцита и % эритроцитов, имеющих на поверхности микроорганизмы.

При репрезентативной выборке достоверной частоты встречаемости – $\geq 90,0$ % поля зрения микроскопа выявили многоэтапный процесс формирования трехмерной структуры биопленок в виде плотной сети, состоящей из бактериальных и дрожжевых клеток, гифальных и псевдогифальных форм, окружённых межклеточным полимерным матриксом (рис. 1).

Дисперсия при разрушении межклеточного матрикса и отделении бактериальных и дрожжевых клеток от микроколоний в виде обособленных разветвленных структур, колонизирующих свободные от микроорганизмов участки субстрата. В периферической части микроколоний экзоцеллюлярный матрикс постепенно истончался, выявлялись нарушение упорядоченности структуры популяции, как правило, при увеличении светопреломления и снижении оптической плотности выявлялись везикулы, сферопласты, протопласты, *L*-формы, игольчатые и гигантские структуры, клетки-ревертаны, кокковидные формы, деструктурированные, частично или полностью автолизированные клетки.

При изменении формы и снижении метаболизма микроорганизмов наблюдается переход популяции в «некультивируемое состояние», утрачивается способность микроорганизмов формировать ко-

лонии. Для репарации клеточной стенки, реверсии *L*-форм микроорганизмов установлена эффективность питательной среды, содержащей гидролизат панкреатический, маннит, *L*-аспарагин и глицерин. При 22 – 28 °С через 18 – 48 ч наблюдалось формирование прозрачных округлых колоний с ровными краями (КОЕ $57,8 \pm 1,7$ – $63,5 \pm 1,3$); количество шероховатых колоний (КОЕ $2,33 \pm 0,7$ – $4,07 \pm 0,9$) составляло 1,2 – 2,6 %, специфичность среды 80,4 – 97,4 %.

Перспективы дальнейших исследований – расширение границ познаний дифференциации гетерогенной структуры биопленок; фенотипические признаки адаптационных стратегий некультивируемых микроорганизмов; факторы вирулентности патогенов; изучение биологических свойств эпидемических и эпизоотических штаммов для оптимизации схемы микробиологической диагностики технологий химиотерапевтических и дезинфицирующих препаратов.

Обсуждение полученных результатов

Анализируя результаты исследований констатируем, что эволюционно сложившийся механизм адаптации за счет проявления и закрепления мутаций, межклеточная коммуникация, сорбция и

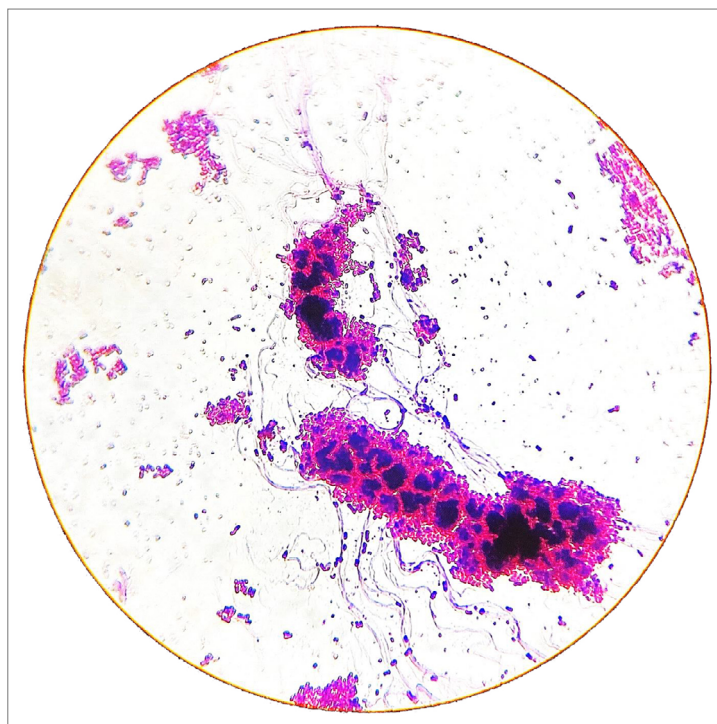


Рисунок 1. Интенсивность формирования биопленок микроорганизмов 37 °С, 48 ч: архитектура биопленки из коагрегации бактерий, дрожжевых и мицелиарных форм грибов, объединенных экзоцеллюлярным матриксом, и длинные разветвленные гифальные формы, формирующие плотные структуры, состоящих из псевдомицелия. Окраска по Граму. Ок. 10, об. 100, иммерсия

агрегация гетерогенных биопленок, циклические режимы роста обуславливают персистенцию некультивируемых микроорганизмов в межэпидемические и межэпизоотические периоды (Ленченко, 1996; Ленченко и соавт., 2014; Lenchenko et al., 2018, 2019).

Длительность и ретроспективность исследований сопряжены с изменчивостью фенотипических признаков, вариабельностью поверхностных антигенов, селекцией и трансмиссией генетических элементов (Ленченко, 1996; Сысоева и соавт., 2003; Скородумов и соавт., 2012; Barecca et al., 2016; Konkakova et al., 2016; Kontsevaya, Shambazova, 2019; Гламаздин и соавт., 2019).

Деструкция межклеточного матрикса биопленок достигается сочетанием колистина (9,0 мг/кг) и рифампицина (37,8 мг/кг), снижающих количество микроорганизмов (КОЕ) – $3,56 \pm 0,12 - 6,92 \pm 0,22$ (Cai Y. et al., 2018). Наличие транскрипционного фактора «TEC1» обеспечивает защиту биопленки от диффузии лекарственных средств, воздействие фарнезола в концентрации 12,5 % выявляли значительное снижение (56,2 %) биомассы биоплёнок (Carreiro et al., 2017). Комбинация групп препаратов β -лактамаминогликозид проявляют синергическое действие, так, имипенем (4,0–5,0 г/день) – тобрамицин (7,0 мг/кг) обеспечивали снижение количества микроорганизмов в тканях ($\leq 2,51 \log_{10}$ КОЕ) через 24 ч (Yadav et al., 2017). Комплексные ферментные препараты способствовали снижению адгезии микроорганизмов, нарушению мицелиального роста, уменьшению оптической плотности до 53,0 % (Ленченко, Ванина, 2005; Сачивкина и соавт., 2008; Mannarova, Shajhulow, 2018).

Альтернативные подходы деконтаминации пищевого сырья и пищевых производств: колицины, экспрессируемые *E.coli*, бактериофаги сальмонелл и псевдомонад ингибирующие рост dormantных форм микроорганизмов (Ленченко и соавт., 2014; Maarten et al., 2018). Бактериофаги сальмонелл и псевдомонад, вызывающие лизис культур микроорганизмов (McVay et al., 2007). Комбинированное воздействие ультрафиолетовых лучей и озонирования оказывало выраженное воздействие на снижение количества бактерий и плесневых грибов (Абдуллаева и соавт., 2017; Abdullaeva et al., 2019). Современные полимерные композиционные материалы и использование ультразвуковой обработки их расплавов, а также компоненты природного происхождения увеличивают технологические и эксплуатационные показатели пищевого сырья и готовой продукции (Кирш, Фролова, 2016; Beznaeva et al., 2018; Бакуменко и соавт., 2019).

Для детекции жизнеспособных микроорганизмов в составе гетерогенной популяции микроорганизмов *in vitro* и *in vivo* установлена эффективность инструментальных способов, в том числе флуоресцентная, проточная цитометрия, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия (Ленченко и соавт., 2014; Cai et al., 2018; Chandra et al., 2001; Lenchenko et al., 2019; Cadavid et al., 2019).

Заключение

Снижение колонизационной резистентности, избыточный рост микроорганизмов в биотопах органов способствуют формированию биопленок патогенных микроорганизмов, продуцирующих адгезивные антигены, бактериоцины, гемолизины и характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью, популяционной изменчивостью, снижением процессов метаболизма, и переходом популяции в «некультивируемое состояние».

Биосинтез экзополисахаридов представляет собой многоэтапный процесс, приводящий к смене бактериями фенотипических признаков по сравнению с их планктонными формами.

Апробированы и подобраны эффективные способы детекции гетероморфных биоплёнок – сообщества микроорганизмов, секретирующих полимерный матрикс и адгезированных к тканям восприимчивых видов животных и абиотическим поверхностям пищевых производств.

Разработка ускоренных методов детекции биопленок и дифференциации некультивируемых микроорганизмов позволит научно обосновать и разработать комплекс мероприятий, направленных на предупреждение заболеваний животных и получение безопасных продуктов животноводства, с целью профилактики заболеваний человека.

Литература

- Абдуллаева, А. М., Смирнова, И. Р., Трохимец, Е. В., & Губанкова, А. А. (2017). Микробиологический контроль полуфабрикатов из мяса индеек при холодильном хранении. *Ветеринария*, 8, 49–53.
- Андрюков, Б. Г., Сомова, Л. М., Матосова, Е. В., & Ляпун, И. Н. (2018). Фенотипическая пластичность бактерий как стратегия резистентности и объект современных антимикробных технологий. *Современные технологии в медицине*, 11(2), 164–182. <http://dx.doi.org/10.17691/stm2018.11.2.22>
- Бакуменко, О. Е., Андреева, А. А., & Алексеен-

- ко, Е. В. (2019). Изучение влияния рецептурных ингредиентов на показатели качества мясных консервов для детского питания. *Health, Food and Biotechnology*, 1(1), 61-74. <http://dx.doi.org/10.36107/hfb.2019.i1.s3>
- Блинкова, Л. П., Пахомов, Ю. Д., & Стоянова, Л. Г. (2010). Свойства некультивируемых и покоящихся форм микроорганизмов. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*, 3, 67-76.
- Гламаздин, И. Г., Сысоева, Н. Ю., Сикоева, П. К., Першина, Т. А., & Крюковская, Г. М. (2019). Поражение свинины тканевыми цистами, контроль сырья при саркоцистозе. *Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*, 2(30), 121-125. <http://dx.doi.org/10.25725/vet.san.hyg.ecol.201902002>
- Кириш, И. А., & Фролова, Ю. В. (2016). Антимикробные упаковочные материалы для мясной отрасли. *Мясные технологии*, 6, 20-21.
- Ленченко, Е. М. (1996). Морфофункциональные свойства и популяционная изменчивость иерсиний, поражающих сельскохозяйственных животных, в зависимости от температурного фактора. *Сельскохозяйственная биология*, 6, 88-95.
- Ленченко, Е. М., & Ванина, Н. Н. (2005). Морфология органов пищеварения и микрофлора кишечника цыплят при заражении *Escherichia coli*. *Сельскохозяйственная биология*, 4, 69-74.
- Ленченко, Е. М., Мансурова, Е. А., & Моторыгин, А. В. (2014). Характеристика токсигенности энтеробактерий, выделенных при желудочно-кишечных болезнях сельскохозяйственных животных. *Сельскохозяйственная биология*, 2, 94-104.
- Ленченко, Е. М., Кхай, Ф. В., Ватников, Ю. А., Медведев, И. Н., & Гаврилов, В. А. (2017). Этиологическая структура и дифференциальная диагностика сальмонеллеза птиц. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство*, 12(4), 359-367. <http://dx.doi.org/10.22363/2312-797X-2017-12-4-359-367>
- Сачивкина, Н. П., Кравцов, Э. Г., & Васильева, Е. А. (2008). Изучение фермента литиказы как нового антимикотического препарата. *Вестник РУДН, серия Агрономия и животноводство*, 3, 37-43.
- Скородумов, Д. И., Ярикова, Ю. А., & Павлова, Е. В. (2012). Роль бактериальных биопленок в инфекционной патологии животных и пищевых производствах. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*, 4, 4-7.
- Сысоева, Н. Ю., Субботин, В. В., & Верховская, Г. Л. (2003). Использование лактобифадола для коррекции нарушения деятельности желудочно-кишечного тракта ягнят при подготовке к дегельминтизации. *Ветеринарная патология*, 2(6), 44-46.
- Abdullaeva, A. M., Blinkova, L. P., Seryogin, I. G., Udavliev, D. I., Shikhov, S.S., & Pakhomov, Yu. D. (2019). Preventive treatment of drying chamber with uv radiation and ozonization for protection against spoilage of raw smoked sausages. *RAP Conference Proceedings*, 4, 206-211. <http://dx.doi.org/10.37392/RapProc.2019.42>
- Becerra, S. C., Roy, D. C., Sanchez, C. J., Christy, R. J., & Burmeister, D. M. (2016). An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. *BMC research notes*, 216(9), 10. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-016-1902-0>
- Beznaeva, O., Kirsh, I., Bannikova, O. (2018). Surface structure of electret polymeric materials in different process conditions by corona discharge. *Amazonia Investiga*, 7(14), 39-49.
- Cadavid, E., & Echeverri F. (2019). The Search for Natural Inhibitors of Biofilm Formation and the Activity of the Autoinductor C6-AHL in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884. *Biomolecules*, 2(6), 1-12. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9020049>
- Cai, Y., Yang, D., Wang, J., & Wang, R. (2018). Activity of colistin alone or in combination with rifampicin or meropenem in a carbapenem-resistant bioluminescent *Pseudomonas aeruginosa* intraperitoneal murine infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 456-461. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx399>
- Carreiro, A. P., Guedes, S. F., Panariello, B. H., Silveira, P. V., Janal, M. N., & Duarte, S. (2017). Farnesol Antibiofilm Activity against *Candida albicans* Reference and Mutant Strains. *Microbiology Research Journal International*, 22(6), 1-7. <http://dx.doi.org/10.9734/MRJI/2017/39345>
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*, 183(18), 5385-5394. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.183.18.5385-5394.2001>
- Fangjun, C., Zhangcheng, L., Shimei, L., Wei, L., Xiaoyan, Z., Zuoyong, S., Zhenhui, W., Juan, Z., & Manli, S. (2018). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* associated with cattle infections in southwest China using multi-locus sequence typing (MLST), antibiotic resistance and virulence-associated gene profile analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1(49), 93-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.004>
- Kontsevaya, S., & Shambazova, S. (2019). Electronic Certification as an Instrument of Effective Veterinary Control in the Turnover of Animal Origin Products. *Advances in Biological Sciences Research*, 7, 160-162. <https://dx.doi.org/10.2991/isils-19.2019.38>
- Kondakova, I. A., Lenchenko, E. M., & Lomova, J. V. (2016). Dynamics of immunologic indices in

- diseases of bacterial etiology and the correction of immune status of calves. *Journal of Global Pharma Technology*, 11(8), 8–11. <http://dx.doi.org/10.14202/JoGPT.2016.121-160>
- Lenchenko, E., Lozovoy, D., Strizhakov, A., Vatnikov, Yu., Byakhova, V., Kulikov, E., Sturov, N., Kuznetsov, V., Avdotin, V., & Grishin, V. (2019). Features of formation of *Yersinia enterocolitica* biofilms. *Veterinary World*, 12(1), 136–140. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2019.136-140>
- Lenchenko, E. M., Vatnikov, Y. A., Sotnikova, E. D., Kulikov, E. V. Gnezdilova., L. A., Seleznev, S. B., Strizhakov, A. A., & Kuznetsov, V. I. (2017). Experimental toxemia of chickens contaminated with *Yersinia enterocolitica* Bacteria. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 11(1), 91–96. <http://dx.doi.org/10.22377/ajp.v11i01.1094>
- Maarten, G. K., & Ghequire, B. Ö. (2018). A Colicin M-Type Bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa* Targeting the HxuC Heme Receptor Requires a Novel Immunity Partner. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18), 6–10. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00716-18>
- Mannapova, R. T., & Shajhulow, R. R. (2018). Dynamics of *Lactobacillus* spp. against the backdrop of candidiasis in the digestive tract of geese. In *Scientific research of the SCO countries: Synergy and integration* (p. 248–252).
- McVay, C. S., Velásquez, M., & Fralick, J. A. (2007). Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), 1934–1938. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01028-06>
- Nidaullah, H., Abirami, N., Shamila-Syuhada, A. K., Chuah, L. O., Nurul, H., Tan, T. P., Abidin, F. W., & Rusul, G. (2017). Prevalence of *Salmonella* in poultry processing environments in wet markets in Penang and Perlis. *Veterinary World*, 10(3), 286–292. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2017.286-292>
- Pakhomov, Y. D., Belus, S. K., Blinkova, L. P., Stoyanova, L. G., & Ustyugova, E. A. (2012). Experimental approach to the induction of nonculturable state of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development*, 7, 45–50.
- Pate, M., Mičunovič, J., Golob, M., Vestby, L. K., & Ocepek M. (2019). *Salmonella infantis* in broiler flocks in Slovenia: the prevalence of multidrug resistant strains with high genetic homogeneity and low biofilm-forming ability. *BioMed Research International*, 51(6), 238–242. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/4981463>
- Sachivkina, N., Lenchenko, E., Strizakov, A., Zimina, V., Gnesdilov, L., Gavrilov, V., Byakhova, V., Germanova, S., Zharov, A., & Molchanova, M. (2018). The Evaluation of formation of biomembrane by microscopic Fungi of the *Candida* Genus. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4), 738–744. <http://dx.doi.org/10.31838/ijpr/2018.10.04.128>
- Santos, T., Luana, O., Varjão, M., Nery, L., Silva, N., Castro, R., Pereirab, L., Hoferb, E., Cristina, D., Rogeria, V., & Almeida, C. (2018). *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control*, 88, 131–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.015>
- Sicard, J-F., G. L., Bihan, P., Vogelee, M., & Jacques, J. (2017). Harel Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7 (387), 1–12. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2017.00387>
- Sushma, V., Nehra, V., & Jakhar, K. (2018). Aetio-Pathological studies of digestive and respiratory affections in lambs. *The Pharma Innovation Journal*, 5 (7), 100–105.
- Surgers, L., Boyd, A., Girard, P. M., Arlet, G., & Decré, D. (2019). Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 309(1), 13–18.
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2018). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology*, 76, 513–517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Tankhiwale, S., & Nagar, H. (2016). Beta-lactamases in *P. aeruginosa*: A threat to clinical therapeutics. *Current Pediatric Research*, 20(12), 253–257.
- WHO, (2018). *Estimates of the global burden of foodborne diseases*. World Health Organization.
- Yadav, R., Bulitta, J. B., Wang, J., Nation, R. L., & Landersdorfer, C. B. (2017). Evaluation of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model-Based Optimized Combination Regimens against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Thigh Infection Model by Using Humanized Dosing Schemes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12), 8–11. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01268-17>

The Indication of Biofilms and Non-Cultivated Microorganisms while Monitoring the Biological Safety of Food Raw Materials

Ekaterina M. Lenchenko

*Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: lenchenko.ekaterina@yandex.ru*

Nataliya Y. Sysoeva

*Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: 864365@mail.ru*

Dmitriy A. Blumenkrants

*Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: blumenkrants@inbox.ru*

The relevance of the study and the presence of gaps in existing knowledge on the topic. Monitoring the biosafety of food raw materials by microbiological indicators is an urgent problem due to an increase in the number of foodborne infections worldwide.

The aim of the work is to study the features of the formation of biofilms and uncultured microorganisms under various cultivation conditions.

Methods. Morphometric and densitometric indicators of biofilms and uncultured microorganisms were studied under various cultivation conditions. To study the growth and development of populations of microorganisms, media containing growth factors for cell wall repair and L-shape reversal of microorganisms were used.

Results and discussion. Microbiological control of critical points in animal husbandry technology and food production has examined the species composition and etiological significance of virulence factors of strains producing adhesive antigens, bacteriocins, hemolysins, toxins, extended-spectrum β -lactamases, which determine the tendency to increase multidrug resistance. The morphological and functional features of biofilms, which are communities of microorganisms that secrete the polymer matrix and adhere to tissues of susceptible animal species and abiotic surfaces of livestock buildings and food production, were studied. Direct correlative relationships between filamentation, dispersion multi-species biofilms of microorganisms and the development of dystrophic and necrotic processes in the tissues and organs of mammals and birds have been established. To optimize the microbiological diagnosis of infectious diseases, effective methods for detecting heteromorphous biofilms and uncultured microorganisms have been tested and selected. To prevent the formation of biofilms of pathogenic microorganisms, drugs that reduce the level of microbiological parameters of primary contamination are promising; minimize adhesive properties, as well as biocides that destroy the intercellular matrix.

Conclusions. The ability to form biofilms, the variability of phenotypic characters, the multiplicity of virulence factors, the emergence of resistant forms of bacteria due to the synthesis of exopolysaccharides, significantly reduce the effectiveness of antiepidemic and diagnostic measures. The development of accelerated methods for the detection of biofilms and the differentiation of uncultured microorganisms will make it possible to scientifically substantiate and develop a set of measures aimed at preventing animal diseases and obtaining safe livestock products in order to prevent human diseases.

Keywords: adhesion, matrix, biofilms, bacteriocins, hemolysins, dissemination, colonization resistance, L-forms, uncultured microorganisms

How to Cite

Lenchenko, E. M., Sysoeva, N. Y., & Blumenkrants, D. A. (2019). The Indication of Biofilms and Non-Cultivated Microorganisms while Monitoring the Biological Safety of Food Raw Materials. *Health, Food & Biotechnology*, 1(3). <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i3.s260>

References

- Abdullaeva, A. M., Smirnova, I. R., Trochemets, E. V., & Gubankova A. A. (2017). Microbiological control of semi-finished products from turkey meat during refrigerated storage. *Veterinariya* [Veterinary Science], 8, 49–53.
- Andryukov, B. G., Somova, L. M., Matosova, E. V., & Lyapun, I. N. (2018). Phenotypic plasticity of bacteria as a strategy of resistance and an object of modern antimicrobial technologies. *Sovremennye tekhnologii v medicine* [Modern technologies in medicine], 11(2), 164–182. <http://dx.doi.org/10.17691/stm2018.11.2.22>
- Bakumenko, O. E., Andreeva, A. A., & Alekseenko, E. V. (2019). Study of the influence of prescription ingredients on the quality indicators of canned meat for baby food. *Health, Food and Biotechnology*, 1(1), 61–74. <http://dx.doi.org/10.36107/hfb.2019.i1.s3>.
- Blinkova, L.P., Pakhomov, Yu.D., & Stoyanova, L.G. (2010). Properties of uncultivated and resting forms of microorganisms. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya* [Immunopathology, allergology, infectology], 3, 67–76.
- Glamazdin, I.G., Sysoeva, N.Yu., Sikoeva, P. K., Pershina, T. A., & Kryukovskaya, G. M. (2019). The defeat of pork tissue cysts, the control of raw materials with sarcocystosis. *Rossiiskij zhurnal Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i ekologii* [Russian Journal of Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology], 2(30), 121–125. <http://dx.doi.org/10.25725/vet.san.hyg.ecol.201902002>.
- Kirsh, I. A., & Frolova, Yu. V. (2016) Antimicrobial packaging materials for the meat industry. *Myasnye tekhnologii* [Meat Technologies], 6, 20–21.
- Lenchenko E. M. (1996). Morphofunctional properties and population variability of Yersinia affecting farm animals, depending on the temperature factor. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 6, 88–95.
- Lenchenko E. M., Vanina N. N. (2005). Morphology of the digestive organs and intestinal microflora of chickens infected with Escherichia coli. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 4, 69–74.
- Lenchenko, E. M., Mansurova, E. A., & Motorygin, A. V. (2014). Characterization of toxigenicity of enterobacteria isolated in gastrointestinal diseases of farm animals. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2, 94–104.
- Lenchenko, E. M., Khai, F. V., Vatnikov, Yu. A., Medvedev, I. N., & Gavrilov, V. A. (2017). Etiological structure and differential diagnosis of avian salmonellosis. *Vestnik Rossijskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstvo* [Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Series: Agronomy and Livestock], 12(4), 359–367. <http://dx.doi.org/0.22363/2312-797X-2017-12-4-359-367>.
- Sachivkina, N. P., Kravtsov, E. G., & Vasilieva, E. A. (2008). The study of the enzyme lithicase as a new antimycotic drug. *Vestnik Rossijskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstvo* [Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Series: Agronomy and Livestock], 3, 37–43.
- Skorodumov, D. I., Yarikova, Yu. A., & Pavlova, E. V. (2012). The role of bacterial biofilms in the infectious pathology of animals and food production. *Veterinariya sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh* [Veterinary of farm animals], 4, 4–7.
- Sysoeva, N. Yu., Subbotin, V. V., & Verkhovskaya, G. L. (2003). The use of lactobifadol to correct the violation of the gastrointestinal tract of lambs in preparation for deworming. *Veterinarnaya patologiya* [Veterinary Pathology], 2(6), 44–46.
- Abdullaeva, A. M., Blinkova, L. P., Seryogin, I. G., Udavliev, D. I., Shikhov, S. S., & Pakhomov, Yu. D. (2019). Preventive treatment of druing chamber with uv radiation and ozonization for protection against spoilage of rav smoked sausages. *RAP Conference Proceedings*, 4, 206–211. <http://dx.doi.org/10.37392/RapProc.2019.42>
- Becerra, S. C., Roy, D. C., Sanchez, C. J., Christy, R. J., & Burmeister, D. M. (2016). An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. *BMC research notes*, 216(9), 10. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-016-1902-0>
- Beznaeva, O., Kirsh, I., Bannikova, O. (2018). Surface structure of electret polymeric materials in different process conditions by corona discharge. *Amazonia Investiga*, 7(14), 39–49.
- Cadavid, E., & Echeverri F. (2019). The Search for Natural Inhibitors of Biofilm Formation and the Activity of the Autoinductor C6-AHL in Klebsiella pneumoniae ATCC 13884. *Biomolecules*, 2(6), 1–12. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9020049>
- Cai, Y., Yang, D., Wang, J., & Wang, R. (2018). Activity of colistin alone or in combination with rifampicin or meropenem in a carbapenem-resistant bioluminescent Pseudomonas aeruginosa intraperitoneal murine infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 456–461. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx399>
- Carreiro, A. P., Guedes, S. F., Panariello, B. H., Silveira, P. V., Janal, M. N., & Duarte, S. (2017). Farnesol Antibiofilm Activity against Candida albicans Reference and Mutant Strains. *Microbiology Research Journal International*, 22(6), 1–7. <http://dx.doi.org/10.9734/MRJI/2017/39345>
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L.,

- McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*, 183(18), 5385–5394. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.183.18.5385-5394.2001>
- Fangjun, C., Zhangcheng, L., Shimei, L., Wei, L., Xiaoyan, Z., Zuoyong, S., Zhenhui, W., Juan, Z., & Manli, S. (2018). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* associated with cattle infections in southwest China using multi-locus sequence typing (MLST), antibiotic resistance and virulence-associated gene profile analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1(49), 93–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.004>
- Kontsevaya, S., & Shambazova, S. (2019). Electronic Certification as an Instrument of Effective Veterinary Control in the Turnover of Animal Origin Products. *Advances in Biological Sciences Research*, 7, 160–162. <https://dx.doi.org/10.2991/isils-19.2019.38>
- Kondakova, I. A., Lenchenko, E. M., & Lomova, J. V. (2016). Dynamics of immunologic indices in diseases of bacterial etiology and the correction of immune status of calves. *Journal of Global Pharma Technology*, 11(8), 8–11. <http://dx.doi.org/10.14202/JoGPT.2016.121-160>
- Lenchenko, E., Lozovoy, D., Strizhakov, A., Vatnikov, Yu., Byakhova, V., Kulikov, E., Sturov, N., Kuznetsov, V., Avdotin, V., & Grishin, V. (2019). Features of formation of *Yersinia enterocolitica* biofilms. *Veterinary World*, 12(1), 136–140. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2019.136-140>
- Lenchenko, E. M., Vatnikov, Y. A., Sotnikova, E. D., Kulikov, E. V., Gnezdilova, L. A., Seleznev, S. B., Strizhakov, A. A., & Kuznetsov, V. I. (2017). Experimental toxemia of chickens contaminated with *Yersinia enterocolitica* Bacteria. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 11(1), 91–96. <http://dx.doi.org/10.22377/ajp.v11i01.1094>
- Maarten, G. K., & Ghequire, B. Ö. (2018). A Colicin M-Type Bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa* Targeting the HxuC Heme Receptor Requires a Novel Immunity Partner. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18), 6–10. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00716-18>
- Mannapova, R. T., & Shajhulow, R. R. (2018). Dynamics of *Lactobacillus* spp. against the backdrop of candidiasis in the digestive tract of geese. In *Scientific research of the SCO countries: Synergy and integration* (p. 248–252).
- McVay, C. S., Velásquez, M., & Fralick, J. A. (2007). Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), 1934–1938. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01028-06>
- Nidaullah, H., Abirami, N., Shamila-Syuhada, A. K., Chuah, L. O., Nurul, H., Tan, T. P., Abidin, F. W., & Rusul, G. (2017). Prevalence of *Salmonella* in poultry processing environments in wet markets in Penang and Perlis. *Veterinary World*, 10(3), 286–292. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2017.286-292>
- Pakhomov, Y. D., Belus, S. K., Blinkova, L. P., Stoyanova, L. G., & Ustyugova, E. A. (2012). Experimental approach to the induction of nonculturable state of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development*, 7, 45–50.
- Pate, M., Mičunovič, J., Golob, M., Vestby, L. K., & Ocepek M. (2019). *Salmonella infantis* in broiler flocks in Slovenia: the prevalence of multidrug resistant strains with high genetic homogeneity and low biofilm-forming ability. *BioMed Research International*, 51(6), 238–242. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/4981463>
- Sachivkina, N., Lenchenko, E., Strizakov, A., Zimina, V., Gnesdilov, L., Gavrilov, V., Byakhova, V., Germanova, S., Zharov, A., & Molchanova, M. (2018). The Evaluation of formation of biomembrane by microscopic Fungi of the *Candida* Genus. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4), 738–744. <http://dx.doi.org/10.31838/ijpr/2018.10.04.128>
- Santos, T., Luana, O., Varjão, M., Nery, L., Silvae, N., Castro, R., Pereirab, L., Hoferb, E., Cristina, D., Rogeria, V., & Almeida, C. (2018). *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control*, 88, 131–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.015>
- Sicard, J-F., G. L., Bihan, P., Vogelee, M., & Jacques, J. (2017). Harel Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7 (387), 1–12. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2017.00387>
- Sushma, V., Nehra, V., & Jakhar, K. (2018). Aetio-Pathological studies of digestive and respiratory affections in lambs. *The Pharma Innovation Journal*, 5 (7), 100–105.
- Surgers, L., Boyd, A., Girard, P. M., Arlet, G., & Decré, D. (2019). Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 309(1), 13–18.
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2018). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology*, 76, 513–517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Tankhiwale, S., & Nagar, H. (2016). Beta-lactamases in *P. aeruginosa*: A threat to clinical therapeutics.

Current Pediatric Research, 20(12), 253–257.

WHO, (2018). *Estimates of the global burden of foodborne diseases*. World Health Organization.

Yadav, R., Bulitta, J. B., Wang, J., Nation, R. L., & Landersdorfer, C. B. (2017). Evaluation of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model-

Based Optimized Combination Regimens against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Thigh Infection Model by Using Humanized Dosing Schemes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12), 8–11. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01268-17>