

Исследование биопленок энтеробактерий при контроле критических точек технологии животноводства и пищевых производств

Блюменкранц Дмитрий Алексеевич¹, Ленченко Екатерина Михайловна¹

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Корреспонденция, касающаяся этой статьи, должна быть адресована Блюменкранц Дмитрию Алексеевичу, адрес : г. Москва, Россия, Волоколамское шоссе, 11, e-mail: mailto: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 зарегистрированных болезней, передаваемых человеку через сырье и продукты животного происхождения. Во всем мире наблюдается тенденция статистически достоверного возрастания эпидемиологических показателей, доля указанных патологий возрастает и ветеринарной медицины. **Цель работы** – сравнительная оценка и подбор эффективных способов изучения формирования биопленок энтеробактерий, циркулирующих среди восприимчивых видов животных и выделенных из пищевого сырья. **Методы.** Изучение роста и динамики развития биопленок энтеробактерий проводили при культивировании на питательных средах, содержащих ростовые факторы для репарации клеточной стенки и реверсии жизнеспособных некультивируемых микроорганизмов. Для исследования морфофункциональных закономерностей развития популяции микроорганизмов *in vitro* и *in vivo* применяли общепринятые и разработанные нами способы подготовки препаратов для сканирующей, просвечивающей фазово-контрастной, оптической и люминисцентной микроскопии. **Результаты и их обсуждение.** При микробиологическом контроле критических точек технологии животноводства и пищевых производств 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. Разработанные способы культивирования биопленок позволили исследовать биопленки энтеробактерий *in vitro* и *in vivo*, без нарушения естественной архитектоники популяции микроорганизмов, определять компоненты экстрацеллюлярного матрикса. Для исследований динамики морфофункциональных закономерностей развития популяций микроорганизмов перспективными признаны рутинные и технологические достижения современности, так, сканирующая электронная микроскопия позволяет оценить степень образования и морфологический состав биопленок. Фазово-контрастная микроскопия выявлять процессы, в зависимости от состава среды и содержания кислорода в среде культивирования. **Выводы.** Способы культивирования биопленок *in vitro* и *in vivo* без нарушения естественной архитектоники биопленок позволили оптимизировать подготовку образцов к исследованию и исключить рутинные стадии подсчета колоний, значительно увеличить число проводимых анализов. За счет простоты операций и минимализации ручного труда, увеличивается производительность, повышается безопасность работы, снижаются затраты рабочего времени персонала, исключаются субъективные факторы. Для разработки комплекса противоэпизоотических и диагностических мероприятий приоритетным направлением является раскрытие научных познаний в области фундаментальных исследований экологической пластичности и адаптации потенциально-патогенных энтеробактерий к паразитированию в теплокровном организме птиц и млекопитающих. Это позволит решать прикладные задачи контроля критических точек технологии животноводства и пищевых производств,

разрабатывать эффективные химиотерапевтические и дезинфицирующие препараты для снижения коагрегации клеток и детекции жизнеспособных некультивируемых микроорганизмов.

Ключевые слова: адгезия, микроколонии, матрикс, биоплёнки, коагрегация, дисперсия, жизнеспособность

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. Во всем мире наблюдается тенденция статистически достоверного возрастания эпидемиологических показателей, доля указанных патологий возрастает и ветеринарной медицины¹. В структуре инфекционной патологии значительную долю составляют хронически протекающие заболевания, вызываемые бактериями, составной частью жизненного цикла, которых является формирование биопленок (Lenchenko et al., 2019). Для исследования биопленок используются динамические и статические методы культивирования микроорганизмов *in vitro* и *in vivo*, позволяющих определять компоненты экстрацеллюлярного матрикса, структуру, уровень экспрессии генов при формировании биопленок микроорганизмов (Ленченко, 1996; Ленченко, 2000). Разработаны способы подготовки препаратов для оптической и сканирующей электронной микроскопии, позволяющие оценить степень образования и морфологический состав биопленок, без нарушения естественной архитектоники популяций микроорганизмов (Ленченко, 2000). При фазово-контрастной микроскопии выявлены процессы, в зависимости от состава среды и содержания кислорода в среде культивирования, установлена агрегация подвижных клеток, вместе с тем, клетки мутантов, лишённые полярных жгутиков, не обладали способностью к подобной быстрой агрегации (Crouch, 2020). При конфокальной микроскопии трехмерные изображения биопленок, позволяют выявить структуру биоплёнки, динамику и скорость процесса осаждения клеток. Конфокальные изображения также позволяют определить коэффициент шероховатости поверхности биоплёнки (Xiaofan, Ingmar, 2020).

Цель работы – сравнительная оценка и подбор эффективных способов изучения формирования

биопленок энтеробактерий, циркулирующих среди восприимчивых видов животных и выделенных из пищевого сырья.

Материалы и методы. В опытах использовали референтные штаммы микроорганизмов из коллекции Глобального Биоресурсного центра² (ATCC: *The Global Bioresource Center*).

Оценку жизнеспособности бактерий, проводили путем посева бактерий с в питательный бульон, фенотипические признаки бактерий определяли общепринятыми методами (Сидоров и соавт., 1995).

В опытах использовали препарат: «Цефтриаксон» («ООО БИОХИМИК», Россия). Микроорганизмы культивировали при 37°C, 6–144 – контроль; при воздействии препаратов – опыт.

Для исследования морфометрических показателей биопленок с применением оптической микроскопии препараты фиксировали смесью спирт: эфир (1:1) – 10 мин, окрашивали по Граму, с применением набора для окраски по Граму («БиоВитрум», Россия). Препараты для сканирующей электронной микроскопии фиксировали 4,0%-ным раствором глутарового альдегида, 30–40 мин и парами 1,0% OSO_4 , 5–10 мин. Для люминесцентной микроскопии использовали краситель «Live/Dead» («Thermo Fisher Scientific», США), в концентрации 1 мг/мл, наносили на поверхность стекла, покрывали покровным стеклом, окрашивали при 25 °C, 10 мин в темноте. Фазово-контрастную микроскопию проводили с использованием 18-часовых бульонных культур микроорганизмов в концентрации 105 КОЕ/мл.

Показатели коагрегации микроорганизмов устанавливали с применением микропланшетного фотометрического анализатора «Immunochem-2100» («HTI», USA) при длине волны 490 нм. Оптическую плотность (OD) определяли динамически на каждом временном этапе культивирования (0, 60, 120 и 240 мин).

¹ FAO, (2019). *The State of Food and Agriculture: Migration, Agriculture and Rural Development*. Food and Agriculture Organization, Roma, Italy / URL: <http://www.fao.org/about/meetings/conference/c2019/en/>

² ATCC: The Global Bioresource Center (2021). <https://www.lgcstandards-atcc.org>

Изучение биопленок *in vivo* проводили на беспородных лабораторных мышах, массой тела 14–16 г ($n=3$), которым *per rectum* вводили взвесь культур микроорганизмов *E.coli* O26:A20, в дозе 0,5 см³ в концентрации 1 млрд/см³ (Lebeaux et al., 2019).

При проведении морфометрических исследований применяли: оптический микроскоп «*Trinocular Unico H604*» («*Trinocular Unico*», USA); сканирующий электронный микроскоп «*Hitachi TM 4000 Plus*» (*Hitachi High-Technologies Corp.*, Japan), электронный микроскоп «*Hitachi-800*» со сканирующей приставкой «*Hitachi-8010*»; фазово-контрастный микроскоп «*Leica LMD 7000*» (*Leica*, Germany); люминесцентный микроскоп «*Leica DMRB*» (*Leica*, Germany), оборудованный 100-кратным масляным иммерсионным объективом с дихроичным фильтром возбуждения длиной волны 510 нм и фильтром длинных частот 615 нм. Для получения репрезентативной информации исследования проводили методом случайного отбора поля зрения микроскопа.

Результаты экспериментальных данных обрабатывали методом статистического анализа с использованием критерия достоверности по Стьюденту, результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований. При формировании биопленок наблюдались этапы: седиментация, фиксация, монослой клеток, коагрегация, микроколонии, кластеры, дисперсия.

На первом этапе исследований через 2–6 ч культивирования микроорганизмов наблюдали седиментацию – адгезию вегетативных форм бактерий, имеющих типичную для вида палочковидную форму и размеры (0,3–0,6 × 0,6–1,0). Окрашенные в синий цвет бактериальные клетки, были объединены в короткие цепочки, на отдельных участках – в длинные нити.

Через 24–48 ч наблюдали формирование монослоя – диффузного слоя бактериальных клеток. На данном этапе выявлялись уплотненные участки биопленки, характеризующиеся наличием палочковидной и округлой формы клеток. Формирование микроколоний на отдельных участках обеспечивалось за счёт процесса коагрегации – образования межклеточных связей, выявлялись различные по величине плотно упакованные клеточные структуры, объединённые межклеточным матриксом.

Межклеточные связи обуславливали популяционную иммобилизацию. Образование вторичных

микроколоний наблюдалось через 48–72 ч. Часть клеток вторичной микроколонии была связана с первичными, выявлялись отделившиеся микроколонии, разделённые матричными пустотами, характеризующиеся наличием клеточных тяжей. Формирование архитектоники биопленки обеспечивается за счёт синтеза внеклеточного матрикса, состоящего из сложных подвижных гелевых структур. Механическую стабильность обеспечивают выявленные на поверхности биоплёнок в виде полимерных сетей экзоцеллюлярные вещества (Рис. 1).

Наиболее полное развитие биоплёнки отмечалось в центральной части микроколоний. Клетки шаровидной формы (0,25–0,30 мкм), располагающиеся на поверхности и внутри анастомозов, образующихся между бактериальными клетками, формировали микроколонии путем колонизации свободных субстратных участков.

Слияние микроколоний с последующей кластеризацией свидетельствует о наличии межклеточных коммуникаций. На линиях формирования кластеров выявлялись поры и каналы округлой формы, характеризующиеся наличием жидкости и окружённые мембранными структурами. Дисперсия колоний наблюдалась через 72–144 ч. На отдельных участках были выявлены деструктивные процессы клеточного матрикса с последующим отделением клеток, сохранивших способность к адгезии и формированию новых колоний.

При воздействии препарата «Цефтриаксон», 18 ч на биопленки энтеробактерий установлена прямая корреляционная связь морфометрических (%) и денситометрических показателей (ODs), отражающих снижение частоты встречаемости кластеров и оптической плотности, соответственно. Частота встречаемости кластеров – агрегации микроорганизмов, объединённых тонким слоем межклеточного матрикса, достоверно снижалась в ряду: *S. enteritidis*, *P. vulgaris* – слабые продуценты биоплёнок; *E. coli*, *K. pneumoniae*, – умеренные продуценты биоплёнок (Рис. 2).

При люминесцентной микроскопии дифференцировали зелёный спектр флуоресценции (495–515 нм) – метаболически активные клетки – жизнеспособные формы; красный спектр флуоресценции (620–650 нм) – нежизнеспособные клетки; оранжевый спектр флуоресценции (516–619 нм) – покоящиеся формы клеток. За счёт формирования различных диссоциативных вариантов, получающих преимущество при фор-

Рисунок 1

Интенсивность формирования биопленок микроорганизмов: а – *K.pneumoniae*, 37°C, 24 ч: бактерии расположены упорядоченно, обособленными разветвленными структурами, выявляются скопления микроорганизмов, объединенные межклеточным матриксом; б – *E.coli*, 37°C, 48 ч: микроколонии, состоящие из коагрегации клеток, окружённых межклеточным полимерным матриксом, различной интенсивности окраски. Генцианвиолет. Ок. 10, об. 100, иммерсия

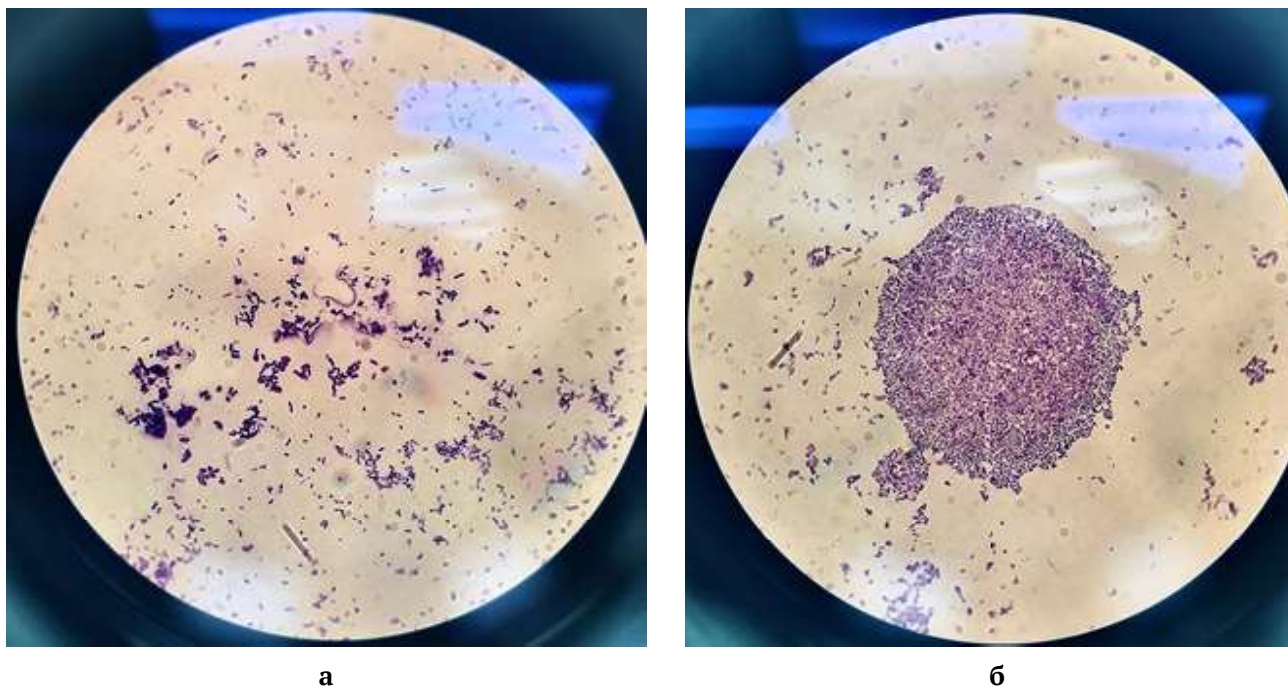
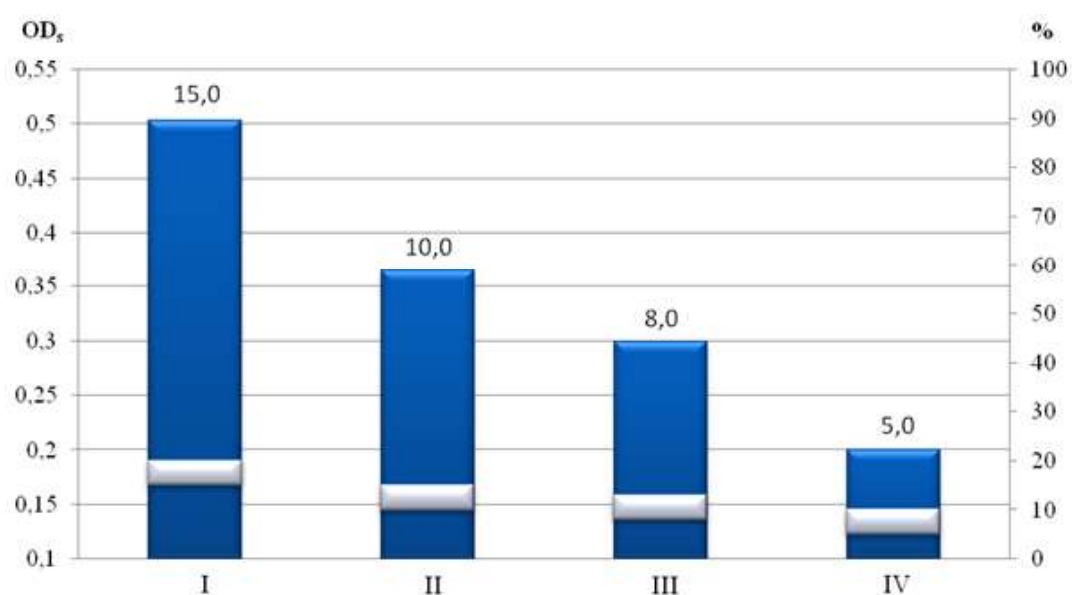


Рисунок 2

Корреляционная связь морфометрических и денситометрических показателей энтеробактерий при воздействии препарата «Цефтриаксон», 100 мкг/мл, 18 ч: I – *E. coli*; II – *K. pneumoniae*; III – *S. enteritidis*; IV – *P. vulgaris*



мировании архитектоники биоплёнок, динамика изменений жизнеспособных структур характеризовалась сменой периодов интенсивности роста микроорганизмов. Использование флуоресцентного красителя «Live/Dead» позволяет дифференцировать физиологическую пластичность популяции микроорганизмов.

В статичных условиях при фазово-контрастной микроскопии 18-часовых жидких культур энтеробактерий выявлены подвижные клетки, сосредоточившиеся в результате аэротаксиса недалеко от границы раздела жидкость/воздух, формирующие небольшие агрегации. Способность бактерий к агрегации в планктонной культуре обуславливает начальные этапы формирования биопленок, но не способствует приросту биомассы зрелых пленок. Подвижность энтеробактерий способствует агрегации в зависимости от состава среды и содержания кислорода в среде культивирования (от степени насыщения среды кислородом). Результаты исследования позволили выявить зависимость степени агрегации клеток в планктонной культуре и формирования ими биопленок от состава среды, продолжительности и условий культивирования, которые, в свою очередь, могут влиять на свойства компонентов клеточной стенки микроорганизмов белковой и полисахаридной природы. Фазово-контрастная микроскопия не требует предварительного окрашивания препаратов, обеспечивает сканирование по вертикали, что позволяет исследовать морфологические изменения различных слоёв биопленок.

При формировании гетерогенной структуры биоплёнок микроорганизмов выявлены процессы диссоциации: 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, $d = 0,2 - 0,5$ мм, G-формы, $d = 0,1 - 0,3$ мм, интенсивность формирования биоплёнок (ID): S-формы – $ID = 0,203 \pm 0,04 - 0,216 \pm 0,12$, R-формы – $ID = 0,107 \pm 0,02 - 0,121 \pm 0,11$.

Изменение формы и снижение метаболизма микроорганизмов приводило к переходу популяции в «некультивируемое состояние», формированию L-форм колоний двух типов: А-колонии, $d \leq 100,0$ мкм, состояли из гранулярных структур, лишённых клеточной стенки; В-колонии, $d \geq 300,0 - 500,0$ мкм, состояли из центральной зоны, врастающей в агар, и прозрачной фестончатой периферической зоны.

Для изучения биопленок *in vivo* моделировали инфекционный процесс, через 18–24 ч после заражения летальность мышей составляла 100,0%, чистые культуры микроорганизмов *E.coli* были реизоли-

рованы из крови, лимфатических узлов, селезенки, сердца, легких, тонкого кишечника, печени, почек.

За счет наличия фимбриальных структур и афимбриальных адгезинов, бактерии, реализующие патогенный потенциал, адгезировались к рецепторам альвеолоцитов мышей. При развитии патологических процессов в лёгких наблюдали дистрофию и слущивание эпителиального слоя, в междольковой соединительной ткани наблюдалась гиперемия и лейкоцитарная инфильтрация, пролиферация фибробластов в периваскулярной соединительной ткани. В полости парабронхов выявлялась светло-розовая сеточка фибрина с наличием эритроцитов и единичных плазмоцитов, просвет бронхов заполнен большим количеством псевдоэозинофилов, лимфоцитов, эпителиальными клетками.

В тонком кишечнике наблюдали адгезию к рецепторам эритроцитов и энтероцитов ворсинок слизистой оболочки терминального отдела подвздошного кишечника мышей. Многоклеточные гетерогенные биопленки энтеробактерий, объединенные межклеточным матриксом, располагались на апикальных полюсах эпителиоцитов ворсинок и крипт терминального отдела подвздошного кишечника мышей. В просвете органа выявляли множество бактерий, экссудат, содержащий десквамированные эпителиальные клетки, с примесью слизи, полиморфноядерные лейкоциты. Инвазивные бактерии вызывали повреждение эпителиального пласта, большинство ворсинок были разрушены, выявляли нарушение эндотелиального слоя кровеносных сосудов, развитие воспалительной гиперемии собственной пластинки слизистой оболочки.

При развитии патологических процессов в почках большинство ядер были уменьшены в объеме. При внедрении микроорганизмов в просвет канальцев, в паренхиме коркового и мозгового слоев отмечали микроабсцессы – участки, состоящие из скоплений клеточных элементов, интенсивно окрашенных гематоксилином. Между некоторыми клубочковыми капсулами и клубочками наблюдали узкие просветы, заполненные однородным розовым веществом. Как правило, выявляли застойный геморрагический инфаркт и некроз эпителия канальцев, вследствие действия на ткань токсинов, воспалительную гиперемию сосудов, с лейкоцитарной инфильтрацией некротических участков, канальцы и капсулы клубочков были заполнены лейкоцитами, просветы не различались в результате распада эпителиальных клеток. Наблюдала множественную бактериальную эмболию кровеносных сосудов, выражен-

ную нейтрофильную инфильтрацию и застойную гиперемии лимфатических узлов и селезенки, генерализованную инфекцию с абсцессами легких, сердце, печени, почек.

Обсуждение

На основании результатов комплексного изучения биологических свойств энтеробактерий выявлены критерии их дифференциации по фенотипическим свойствам от таксономически родственных видов бактерий. Разработан и осуществлен новый подход в изучении экологии и биологии энтеробактерий – использование комплекса электронно-микроскопических и морфометрических методов в сочетании с бактериологическими и гистологическими исследованиями – для выявления факторов патогенности (адгезивности, инвазивности, цитотоксичности), внутривидовой изменчивости энтеробактерий *in vivo* и *in vitro*, пределов адаптации бактерий к изменяющимся условиям среды обитания (Ленченко, 1996; Ленченко, 2000; Ленченко и соавт., 2014).

В свете современных данных биопленка – многоклеточное сообщество, состоящее из клеток, адгезированных к поверхности и объединенных внеклеточным полисахаридным матриксом, характерным является изменение параметров роста и экспрессии специфических генов по сравнению с одиночными (планктонными) бактериями (Ленченко et al., 2019).

Формирование биопленки происходит линейно, включая ряд различных этапов. В процессе формирования биопленки бактериальные клетки образуют микроколонию. Переход к этапу необратимого прикрепления может вести за собой множество предшествующих стадий прикрепления и открепления клетки от поверхности субстрата (Li et al., 2020).

Показатели абсолютных величин оптической плотности биопленки различные: слабые продуценты биопленок, $D \leq 0,197$ – *Y. enterocolitica* R-форма; умеренные продуценты биопленок, $D = 0,311–0,380$ – *S. enteritidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *Y. pseudotuberculosis*; сильные продуценты биопленок – *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Mycobacterium* B5, $D=0,699–1,510$ (Ленченко et al., 2020).

При образовании биопленок штаммами *Salmonella enterica* выявлялась положительная корреляция между общим биологическим объемом биопленки и биологическим объемом живых клеток, белков

и β -полисахаридов, которые могут служить маркерами образования биопленки. Положительная корреляция (от 0,630 до 0,941; $P < 0,01$) была обнаружена между биобъемом, охватом поверхности, максимальной толщиной и средней толщиной биопленок (Camino et al., 2020).

Биосинтез экзополисахаридов представляет собой многоэтапный процесс, приводящий к смене бактериями фенотипических признаков, снижению интенсивности процессов метаболизма и переходу популяции в «некультивируемое состояние» (Ostapska et al., 2020).

При некультивируемом состоянии популяций микроорганизмов дифференцировали: кокковидные формы, мембранные пузырьки (везикулы), клетки с дефектной клеточной стенкой, сферопласты, протопласты, L-формы, игольчатые и гигантские структуры, клетки-ревертанты (Ленченко, 1996; Ленченко, 2000).

Созревание биопленки сопровождается кратным увеличением резистентности к антисептикам входящих в состав бактерий, антибактериальное воздействие на одновидовую биопленку, *S. aureus*, было слабее, чем на одновидовую биопленку *P. aeruginosa* ($p=0,003$) или двухвидовую биопленку ($p=0,040$). Тогда как активность антисептиков в отношении одновидовых биопленок *P. aeruginosa* и двухвидовых биопленок не различалась между собой ($p=0,984$) (Li et al., 2020).

При изучении устойчивости к антибактериальным препаратам 51 изолята сальмонелл, выделенных из 379 проб окружающей среды на птицефермах, серовар *Salmonella enterica* 32/51 (62,7%) был устойчив к одному антибактериальному препарату, 10/51 (19,6%) изолятов демонстрировали множественную лекарственную устойчивость. С помощью ПЦР идентифицировано пять плазмид вирулентности, включая IncFIIS 17/51 (33,3%), IncI1 α 12/51 (23,5%), IncP 8/51 (15,7%), IncX1 8/51 (15,7%) и IncX2 1/51 (2,0%) (Ball et al., 2020).

Доминирующая часть эпизоотических энтеробактерий, выделенных от молодняка сельскохозяйственных животных (64 из 86 изолятов), идентифицировали как *Escherichia coli*, из которых 42 не серотипировались по O-антигену, 35,0% являлись патогенными и 65,0% – непатогенными. Токсигенность выявлена у 53,9% изолятов: умеренно токсигенными и слаботоксигенными свойствами характеризовались 15,4 и 38,5% изолятов, соответственно; нетоксигенными – 46,1% (Ленченко и соавт., 2014).

Микроорганизмы *S. enteritidis*, изолированные из проб свиных отходов свиного комплекса, проявляли устойчивость к сульфаметоксазолу: в сырых отходах было обнаружено 46,0% устойчивых изолятов, в пробах сточных вод – 85,0%. Микроорганизмы обладали устойчивостью к сульфаметоксазолу – 6,0%, хлорамфениколу – 33,0%; ампициллину – 20,0% (Casanova et al., 2020).

Изоляты *S. Kentucky* (n = 11), *S. Enteritidis* (n = 4), *S. Typhimurium* (n = 3), *S. Breanderp* (n = 1), и *S. Newport* (n = 1) идентифицированы при исследовании проб от павших птиц на птицефермах. Исследование противомикробной чувствительности показало, что 95,0% изолятов были устойчивы к пенициллину, 85,0% – норфлоксацину и колистину, 75,0% – гентамицину, 70,0% – налидиксовой кислоте и 60,0% – к флумехину (Magdy et al., 2020).

Изоляты *S. Enteritidis* (n = 15), *S. Typhimurium* (n = 12) и *S. Weltevreden* (n = 8) из проб мяса птицы обладали устойчивостью (100,0%) к хлорамфениколу и офлоксацину (Qamar et al., 2020).

Из 720 проб мяса 57,64% контаминированы антибиотикорезистентными штаммами *Salmonella spp.*, наиболее часто идентифицируемыми сероварами из проб мяса крупного рогатого скота и свиней являлись *S. Anatum* и *S. Saintpaul*; птиц – *S. Anatum*, *S. Kentucky* (Santos et al., 2020).

Установлена эффективность введения в рацион птицы препарата Заслон 2+, содержащего в составе бактерии *Bacillus spp.*, за счёт коррекции дисбиотических нарушений. В кишечнике птиц увеличивалась численность бактерий семейства *Bacillaceae* ($3,59 \pm 0,15$ – $12,50 \pm 0,58\%$), целлюлозолитических бактерий семейства *Clostridiaceae* ($0,31 \pm 0,02$ – $0,97 \pm 0,04\%$) и бактерий рода *Bifidobacterium* ($0,82 \pm 0,03$ – $0,56 \pm 0,03\%$), содержания бактерий рода *Campylobacter* достоверно снижалось ($1,04 \pm 0,06$ – $0,26 \pm 0,01\%$) (Егоров и соавт., 2019).

При исследовании вакцины против сальмонеллёза на основе белков внешней мембраны *Salmonella enterica* (OMP) и белков флагеллина продукция макрофагов через 11 дней после заражения была выше ($P < 0,05$) в группе вакцинированной птицы. На 14-й день вакцинированные птицы (1000 мкг) имели более высокие уровни ($P < 0,05$) сывороточных антител (IgG, IgA), в лимфоузлах слепой кишки (Acevedo-Villanueva et al., 2020).

Основная масса (70,0 – 90,0%) иммуноглобулинов птиц – G (IgG). Циркулирующие лимфоциты несут

на своей поверхности 5,4% IgG, обладающие способностью фиксироваться на клетках ресничного эпителия дыхательных путей и на эпителиальных клетках пищеварительного тракта, что обуславливает защиту от генетически чужеродных веществ через эпителиальные барьеры (Джавадов и соавт., 2017).

Установлена эффективность инактивированной трехвалентной вакцины против *Salmonella enterica*, содержащей серовары *Salmonella Enteritidis* (O: 9, серогруппа D) и *Salmonella Typhimurium* (O: 4, серогруппа B), серовар *Salmonella Infantis* (O: 7, серогруппа C1) и адъювант (гидроксид алюминия) – при заражении птиц *S. Hadar* (O: 8, серогруппа C2) 1×10^6 КОЕ/г выявлено увеличение серовар-специфических антител (34,4%), обнаруживающихся до 56-недельного возраста (Crouch et al., 2020).

Изоляты *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Kentucky*, *S. Heidelberg*, *S. Livingstone*, *S. Mbandaka*, выделенные из проб мяса птицы, демонстрировали вариabельность устойчивости к кислотам и NaCl, высокую термолабильность, устойчивость к окислению и УФ-излучению, по сравнению с *S. Enteritidis* ($r > 0,85$; $p < 0,01$). Значительная взаимосвязь была обнаружена для устойчивости к кислоте и термолабильности ($p < 0,10$) (Guillén et al., 2020).

Бактериофаги *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi A*, *S. San Diego* и *S. Typhi* проявили широкую литическую активность, устойчивость к нагреванию и pH. Частицы фага адсорбировались в 100,0% в течение 18–40 мин. Количество жизнеспособных клеток бактерий снижалось в пробах от мяса куриц ($P < 0,05$) при совместном воздействии бактериофагами при 4 °C в течение 7 дней (Kim et al., 2020).

Штаммы *Lactobacillus spp.* проявляли антагонистическую активность по к 96,0% изолятам *Salmonella spp.*, выделенным из проб объектов окружающей среды птицеперерабатывающих предприятий (Kowalska et al., 2020).

Иммунизация цыплят субъединичной вакциной на основе рекомбинантного белка внешней мембраны (rOmpF) и экстрагированных везикул внешней мембраны (OMV) *S. Enteritidis* вызывает экспрессию антител, высокий уровень клеточно-опосредованного иммунного ответа, снижение колонизации кишечника цыплят *S. Enteritidis* (Li et al., 2020).

При ферментативном воздействии (ДНКазы, 100 мкг/мл) биомасса биопленок изолятов

Salmonella spp., выделенных на мясоперерабатывающих предприятиях убывала на 29,0–40,0%; после инкубации с раствором периодата натрия, окисляющего полисахариды, биомасса зрелых биопленок, сформированных на стекле убывала на 40,0 – 75,0% (Collineau et al., 2020).

Для оптимизации подготовки образцов к исследованию при микробиологическом контроле критических точек технологии животноводства и пищевых производств, перспективным является исключение рутинных стадий подсчета с помощью микробиологических анализаторов «БакТрак 4300» («SY-LAB Gerate GmbH», Австрия); «Trek Diagnostic System Sensititre» («Thermo Fisher Scientific», США), значительно увеличивающих число проводимых анализов, позволяющих экономить время исследований и материальные затраты.

Заключение. При исследовании биопленок с помощью оптической, сканирующей электронной, фазово-контрастной, люминесцентной микроскопии выявлены общие закономерности морфофункционального развития гетерогенной популяции микроорганизмов различных систематических групп. Биосинтез экзополисахаридов представляет собой многоэтапный процесс, приводящий к смене бактериями фенотипических признаков по сравнению с их планктонными формами, созревание биопленки сопровождается кратным увеличением резистентности, что обуславливает длительность и ретроспективность бактериологических исследований. Маркерами образования биопленки могут служить биологический объемом живых клеток, белков и β -полисахаридов.

Литература

- Джавадов, Э. Д., Кононина, М. Д., Терлецкий, В. П., Щепеткина, С. В., & Новикова, О. Б. (2017). Мониторинг генов антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственной птицы. *Актуальные вопросы сельскохозяйственной биологии*, 4(6), 24–29.
- Егоров, И. А., Ленкова, Т. Н., Манукян, В. А., Егорова, Т. А., Никонов, И. Н., Ильина, Л. А., & Лаптев, Г. Ю. (2019). Замещение кормовых антибиотиков в рационах. Микробиота кишечника и продуктивность мясных кур (*Gallus gallus* L.) На фоне энтеросорбента с фито- и пробиотическими свойствами. *Сельскохозяйственная биология*, 2, 280–290.
- Ленченко, Е. М. (2000). *Биология и экология иерсиний – возбудителей пищевых токсикоинфекций* [Диссертация доктора наук, Московский государственный университет пищевых производств], Москва, Россия.
- 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., Мансурова, Е. А., & Моторыгин, А. В. (2014). Характеристика токсигенности энтеробактерий, выделенных при желудочно-кишечных болезнях сельскохозяйственных животных. *Сельскохозяйственная биология*, 2, 94–104.
- Acevedo-Villanueva, K. Y., Lester, B., Renu, S., Han, Y., Shanmugasundaram, R., Gourapura, R., & Selvaraj, R. (2020). Efficacy of chitosan-based nanoparticle vaccine administered to broiler birds challenged with *Salmonella*. *PLoS One*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231998>
- Aung, K. T., Khor, W. C., Octavia, S., Ye, A., Leo, J., Chan, P. P., Lim, G., Wong, W. K., Tan, B. Z. Y., Schlundt, J., Dalsgaard, A., Ng L. C., & Lin, Y. N. (2020). Distribution of *Salmonella* serovars in humans, foods, farm animals and environment, companion and wildlife animals in Singapore. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16). <https://doi.org/10.3390/ijerph17165774>
- Ball, T., Monte, D., Aidara-Kane, A., Matheu, J., Ru, H., Thakur, S., Ejobi, F., & Fedorka-Cray, P. (2020). International lineages of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken farms, Wakiso District, Uganda. *PLoS One*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220484>
- Casanova, L. M., Hill, V. R., & Sobsey, M. D. (2020). Antibiotic-resistant *Salmonella* in swine wastes and farm surface waters. *Letters of Applied Microbiology*, 71(1), 117–123. <https://doi.org/10.1111/lam.13242>
- Chang, R., Pandey, P., Li, Y., Venkitasamy, C., Chen, Z., Gallardo, R., Weimer, B., Jay-Russell, M., & Weimer, B. (2020). Assessment of gaseous ozone treatment on *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 reductions in poultry litter. *Waste Management*, 117, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.039>
- Collineau, L. Phillips, C., Chapman, B., Agunos, A., Carson, C., Fazil, A., Reid-Smith, R. J., & Smith, B. A. (2020). A within-flock model of *Salmonella* Heidelberg transmission in broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104823>
- Crouch, C. F., Nell, T., Reijnders, M., Donkers, T., Pugh, C., Patel, A., Davis, P., Hulten, M. C. W., & Vries, S. P. W. (2020). Safety and efficacy of a novel

- inactivated trivalent *Salmonella enterica* vaccine in chickens. *Vaccine*, 38(43), 6741–6750. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.033>
- Godínez-Oviedo, A., Tamplin, M. L., Bowma, J. P., & Hernández-Iturriaga, M. (2019). *Salmonella enterica* in Mexico 2000-2017: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Prevalence in Food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 98–118. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2627>
- Guillén, S., Marcén, M., Álvarez, I., Mañas, P., & Cebrián, G. (2020). Stress resistance of emerging poultry-associated *Salmonella* serovars. *International Journal of Food Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108884>
- Hwang, D., Rothrock, M. J., Pang, H., Guo, M., & Mishra, A. (2020). Predicting *Salmonella* prevalence associated with meteorological factors in pastured poultry farms in southeastern United States. *Science of the Total Environment*, 713. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136359>
- Jibril, A. H., Okeke, I. N., Dalsgaard, A., Kudirkiene, E., Akinlabi, O. C., Bello, M. B., & Olsen, J. E. (2020). Prevalence and risk factors of *Salmonella* in commercial poultry farms in Nigeria. *PLoS One*, 15(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238190>
- Kim, J. H., Jung, S. J., Mizan, M. F. R., Park, S. H., & Ha, S. D. (2020). Characterization of *Salmonella* spp.-specific bacteriophages and their biocontrol application in chicken breast meat. *Journal of Food Science*, 85(3), 526–534.
- Kowalska, J. D., Nowak, A., Śliżewska, K., Stańczyk, M., Łukasiak, M., & Dastyh, J. (2020). Anti-salmonella potential of new *Lactobacillus* strains with the application in the poultry industry. *Polish Journal of Microbiology*, 69(1), 5–18. <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-001>
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., & Beloin, C. (2013). From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*, 2(2), 288–356. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>
- Lenchenko, E., Blumenkrants, D., Sachivkina, N., Shadrova, N., & Ibragimova, A. (2020). Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Veterinary World*, 13(1), 197–200. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.197-200>
- Lenchenko, E., Blumenkrants, D., Vatnikov, Y., Kulikov, E., Khi, V., Sachivkina, N., Gnezdilova, L., Sturov, N., Sakhno, N., Kuznetsov, V., Strizhakov, A., & Mansur T. (2020). Poultry *Salmonella* sensitivity to antibiotics. *Systematic review pharmacy*, 11(2), 170–175. <https://doi.org/10.5530/srp.2020.2.26>
- 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., Kulikov, E. V., Lozovoy, D. A., Gavrilov, V. A., Gnezdilova, L. A., Zimina, V. N., Kuznetsov, V., L., Annikov, V. V., Medvedev, I. N., Petryaeva, A. V., & Glagaleva, T. I. (2019). Aspects of *Salmonellosis* pathogenesis using chicken models. *Bali Medical Journal*, 8(1), 206–210. <https://doi.org/10.15562/bmj.v8i1.92010>
- 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>
- Li, Q., Ren, J., Xian, H., Yin, C., Yuan, Y., Li, Y., Ji, R., Chu, C., Qiao, Z., & Jiao, X. (2020). rOmpF and OMVs as efficient subunit vaccines against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infections in poultry farms. *Vaccine*, 38(45), 7094–7099. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.074>
- Li, Y., Yang, X., Zhang, H., Jia, H., Liu, X., Yu, B., Zeng, Y., Zhang, Y., Pei, X., & Yang, D. (2020). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in the commercial eggs in China. *International Journal of Food Microbiology*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108623>
- Luvsansharav, U. O., Vieira, A., Bennett, S., Huang, J., Healy, J. M., Hoekstra, R. M., Bruce, B. B., & Cole, D. (2020). *Salmonella* Serotypes: A Novel Measure of Association with Foodborne Transmission. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 151–155. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2641>
- Magdy, O. S., Moussa, M. I., Hussein, H. A., El-Hariri, M. D., Ghareeb, A., Hemeg, H. A., Al-Maary, K. S., Mubarak, A. S., Alwarhi, W. K., Eljakee, J. K., & Kabli, S. A. (2020). Genetic diversity of *Salmonella enterica* recovered from chickens farms and its potential transmission to humans. *Journal of Infection and Public Health*, 13(4), 571–576. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.09.007>
- Mendonça, B. S., de Oliveira, W. R., Pereira, R. S., Santos, L. R., Rodrigues, L. B., Dickel, E. L., Daroit, L., & Pilotto, F. (2021). Research Note: The use of ammonia gas for *Salmonella* control in poultry litters. *Poultry Science*, 100(1), 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.008>
- Parisi, A. A., Phuong, T. L. T., Mather, A. E., Jombart, T., Tuyen, H. T., Lan, N. P. H., Trang, N. H. T., Carrique-Mas, J., Campbell, J. I., Trung, N. V., Glass, K., Kirk, M. D., & Baker, S. (2020). The role of animals as a source of antimicrobial resistant nontyphoidal *Salmonella* causing invasive and non-invasive human disease in Vietnam. *Infection*,

- Genetics and Evolution*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104534>
- Qamar, A., Ismail, T., & Akhtar, S. (2020). Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in South Punjab-Pakistan. *PLoS One*, 15(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232382>
- Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., & Calero-Cáceres, W. (2020). Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1347–1354. <https://doi.org/10.1111/jam.14562>
- Santos, P. D. M., Widmer, K. W., & Rivera, W. L. (2020). PCR-based detection and serovar identification of *Salmonella* in retail meat collected from wet markets in Metro Manila, Philippines. *PLoS One*, 15(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239457>
- Shimojima, Y., Nishino, Y., Fukui, R., Kuroda, S., Suzuki, J., & Sadamasu, K. (2020). *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats in Tokyo, Japan and Their Antimicrobial Susceptibility. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 61(6), 211–217. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.61.211>
- Yang, J., Zhang, Z., Zhou, X., Cui, Y., Shi, C., & Shi, X. (2020). Prevalence and Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolates from Retail Foods in Shanghai, China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(1), 35–43. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2671>
- Xiaofan, J., & Ingmar, H. R. (2020). Biofilm Lithography enables high-resolution cell patterning via optogenetic adhesin expression. *National Academy of Sciences*, 14(115), 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720676115>

Study of Enterobacteria Biofilms Critical Point Control Technologies of Livestock and Food Production

Dmitry A. Blumenkrants¹, Ekaterina M. Lenchenko¹

¹ *Moscow State University of Food Production*

Correspondence concerning this article should be addressed to Dmitry A. Blumenkrants, Moscow State University of Food Production, address: 11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation, e-mail: mailto:blumenkrants@inbox.ru

The relevance of the study and the presence of gaps in the existing knowledge on the topic. Monitoring studies of the biological safety of food raw materials for microbiological indicators is an urgent problem, due to the increase in the number registered diseases transmitted to humans through raw materials and products of animal origin. All over the world, the share of these pathologies is increasing, there is a tendency for a statistically significant increase in epidemiological indicators. The aim of the work is a comparative assessment and selection of effective methods for studying the formation of biofilms enterobacteriaceae circulating among susceptible animal species and isolated from food raw materials. Methods. Study of growth and dynamics development biofilms of Enterobacteriaceae was carried out during cultivation on nutrient media containing growth factors for the repair the cell wall and reversal of viable uncultured microorganisms. To study morphological and functional patterns development a population of microorganisms in vitro and in vivo, we used the generally accepted and developed methods for preparing preparations for scanning, phase contrast, optical and luminescence microscopy, which make it possible to study biofilms without violating the natural architectonics and to detect viable prokaryotic cells. Results and its discussion. During microbiological control of critical points in the technology of animal husbandry and food production, the morphological and functional characteristics of biofilms, which are communities of microorganisms secreting a polymer matrix and adhered to the tissues of susceptible animal species and abiotic surfaces of livestock buildings and food industries, were studied. Microbiological research was carried out using the method of serial dilutions in 0,7 % MPA for accelerated counting of the number mesophilic aerobic and facultatively anaerobic microorganisms isolated from the contents the intestines of animals, as well as food raw materials. The morphometric parameters of biofilms and uncultivated microorganisms were studied under various cultivation conditions. To study the growth and development of populations microorganisms, we used media containing growth factors for cell wall repair and reversal of L-forms of microorganisms. To study the morphometric parameters biofilms using optical microscopy, the preparations were stained according to Gram. Preparations for scanning electron microscopy were fixed with a 4,0 % solution of glutaraldehyde and vapors of 1,0 % osmium oxide. For luminescence microscopy, a «Live/Dead» dye (Thermo Fisher Scientific, United States) was used. Phase contrast microscopy was performed using 18-hour broth cultures of microorganisms. Coaggregation indices of microorganisms were established dynamically, optical density (OD) was determined at each time stage of cultivation (0, 60, 120 and 240 min). The developed methods of biofilm cultivation made it possible to study enterobacteriaceae biofilms in vitro and in vivo, without disturbing the natural architectonics of the population of microorganisms. The use of dynamic and static methods of biofilm cultivation made it possible to determine the components of the extracellular matrix, structure, and the level of gene expression during the formation of biofilms of microorganisms. A direct correlation was established between morphometric (%) and densitometric indicators (ODs), reflecting a decrease in the frequency of occurrence of clusters - aggregations of microorganisms united by a thin layer of the extracellular matrix and optical density, respectively. The ability to form biofilms, the variability of phenotypic traits, the multiplicity of virulence factors, the emergence of resistant forms of bacteria due to the synthesis of exopolysaccharides, significantly reduce the effectiveness of antiepidemiological and diagnostic measures. For the study of the dynamics of morphological and functional patterns of the development of populations of microorganisms, routine and technological advances of

the present are recognized as promising, for example, scanning electron microscopy makes it possible to assess the degree of formation and morphological composition of biofilms. Phase contrast microscopy to reveal processes depending on the composition of the medium and the oxygen content in the culture medium. Confocal microscopy reveals three-dimensional images of the dynamics, rates of the cell deposition process and the roughness coefficient of the biofilm surface. Conclusions. Methods for cultivating biofilms in vitro and in vivo without disturbing the natural architectonics of biofilms made it possible to optimize the preparation of samples for research and eliminate the routine stages of colony counting, and significantly increase the number of analyzes. Due to the simplicity of operations and the minimization of manual labor, productivity increases, the safety of work is increased, the cost of personnel working time is reduced, and subjective factors are excluded. For the development of a complex of antiepidemic and diagnostic measures, a priority direction is the disclosure of scientific knowledge in the field of fundamental studies of ecological plasticity and adaptation of potentially pathogenic enterobacteria to parasitism in the warm-blooded organism of birds and mammals. This will allow solving applied problems of controlling the critical points of livestock and food production technology, developing effective chemotherapeutic and disinfecting drugs to reduce cell coaggregation and detect viable uncultured microorganisms.

Keywords: adhesion, microcolonies, matrix, biofilms, coaggregation, dispersion, viability

References

- Javadov, E. D., Kononina, M. D., Terletskiy, V. P., Shchepetkina, S. V., & Novikova, O. B. (2017). Monitoring of antibiotic resistance genes of pathogenic microorganisms isolated from poultry. *Aktual'nye voprosy sel'skohozyajstvennoj biologii* [Topical issues of agricultural biology], 4(6), 24-29.
- Egorov, I. A., Lenkova, T. N., Manukyan, V. A., Egorova, T. A., Nikonov, I. N., Ilyina, L. A., & Laptev, G. Yu. (2019). Substitution of feed antibiotics in diets. Intestinal microbiota and productivity of meat chickens (*Gallus gallus* L.) Against the background of enterosorbent with phyto- and probiotic properties. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2, 280-290.
- Lenchenko, E. M. (2000). *Biologiya i ekologiya iersinij – vzbuditelej pishchevyh toksikoinfekcij* [Biology and ecology of Yersinia - causative agents of food toxicoinfections] [Doctoral Dissertation, Moscow State University of Food Production], Moscow, Russia.
- 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., Mansurova, E. A., & Motorygin, A. V. (2014). Characteristics of the toxigenicity of enterobacteria isolated from gastrointestinal diseases of farm animals. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2, 94-104.
- Acevedo-Villanueva, K. Y., Lester, B., Renu, S., Han, Y., Shanmugasundaram, R., Gourapura, R., & Selvaraj, R. (2020). Efficacy of chitosan-based nanoparticle vaccine administered to broiler birds challenged with Salmonella. *PLoS One*, 15 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231998>
- Aung, K. T., Khor, W. C., Octavia, S., Ye, A., Leo, J., Chan, P. P., Lim, G., Wong, W. K., Tan, B. Z. Y., Schlundt, J., Dalsgaard, A., Ng L. C., & Lin, Y. N. (2020). Distribution of Salmonella serovars in humans, foods, farm animals and environment, companion and wildlife animals in Singapore. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16). <https://doi.org/10.3390/ijerph17165774>
- Ball, T., Monte, D., Aidara-Kane, A., Matheu, J., Ru, H., Thakur, S., Ejobi, F., & Fedorka-Cray, P. (2020). International lineages of Salmonella enterica serovars isolated from chicken farms, Wakiso District, Uganda. *PLoS One*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220484>
- Casanova, L. M., Hill, V. R., & Sobsey, M. D. (2020). Antibiotic-resistant Salmonella in swine wastes and farm surface waters. *Letters of Applied Microbiology*, 71(1), 117-123. <https://doi.org/10.1111/lam.13242>
- Chang, R., Pandey, P., Li, Y., Venkitasamy, C., Chen, Z., Gallardo, R., Weimer, B., Jay-Russell, M., & Weimer, B. (2020). Assessment of gaseous ozone treatment on Salmonella Typhimurium and Escherichia coli O157:H7 reductions in poultry litter. *Waste Management*, 117, 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.039>
- Collineau, L. Phillips, C., Chapman, B., Agunos, A., Carson, C., Fazil, A., Reid-Smith, R. J., & Smith, A. (2020). A within-flock model of Salmonella Heidelberg transmission in broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104823>
- Crouch, C. F., Nell, T., Reijnders, M., Donkers, T., Pugh, C., Patel, A., Davis, P., Hulten, M. C. W., &

- Vries, S. P. W. (2020). Safety and efficacy of a novel inactivated trivalent *Salmonella enterica* vaccine in chickens. *Vaccine*, 38(43), 6741–6750. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.033>
- Godínez-Oviedo, A., Tamplin, M. L., Bowma, J. P., & Hernández-Iturriaga, M. (2019). *Salmonella enterica* in Mexico 2000-2017: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Prevalence in Food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 98–118. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2627>
- Guillén, S., Marcén, M., Álvarez, I., Mañas, P., & Cebrián, G. (2020). Stress resistance of emerging poultry-associated *Salmonella* serovars. *International Journal of Food Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108884>
- Hwang, D., Rothrock, M. J., Pang, H., Guo, M., & Mishra, A. (2020). Predicting *Salmonella* prevalence associated with meteorological factors in pastured poultry farms in southeastern United States. *Science of the Total Environment*, 713. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136359>
- Jibril, A. H., Okeke, I. N., Dalsgaard, A., Kudirkiene, E., Akinlabi, O. C., Bello, M. B., & Olsen, J. E. (2020). Prevalence and risk factors of *Salmonella* in commercial poultry farms in Nigeria. *PLoS One*, 15(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238190>
- Kim, J. H., Jung, S. J., Mizan, M. F. R., Park, S. H., & Ha, S. D. (2020). Characterization of *Salmonella* spp.-specific bacteriophages and their biocontrol application in chicken breast meat. *Journal of Food Science*, 85(3), 526–534.
- Kowalska, J. D., Nowak, A., Śliżewska, K., Stańczyk, M., Łukasiak, M., & Dastyh, J. (2020). Anti-salmonella potential of new *Lactobacillus* strains with the application in the poultry industry. *Polish Journal of Microbiology*, 69(1), 5–18. <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-001>
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., & Beloin, C. (2013). From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*, 2(2), 288–356. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>
- Lenchenko, E., Blumenkrants, D., Sachivkina, N., Shadrova, N., & Ibragimova, A. (2020). Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Veterinary World*, 13(1), 197–200. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.197-200>
- Lenchenko, E., Blumenkrants, D., Vatnikov, Y., Kulikov, E., Khi, V., Sachivkina, N., Gnezdilova, L., Sturov, N., Sakhno, N., Kuznetsov, V., Strizhakov, A., & Mansur T. (2020). Poultry *Salmonella* sensitivity to antibiotics. *Systematic review pharmacy*, 11(2), 170–175. <https://doi.org/10.5530/srp.2020.2.26>
- 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., Kulikov, E. V., Lozovoy, D. A., Gavrilov, V. A., Gnezdilova, L. A., Zimina, V. N., Kuznetsov, V., L., Annikov, V. V., Medvedev, I. N., Petryaeva, A. V., & Glagaleva, T. I. (2019). Aspects of *Salmonellosis* pathogenesis using chicken models. *Bali Medical Journal*, 8(1), 206–210. <https://doi.org/10.15562/bmj.v8i1.92010>
- 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>
- Li, Q., Ren, J., Xian, H., Yin, C., Yuan, Y., Li, Y., Ji, R., Chu, C., Qiao, Z., & Jiao, X. (2020). rOmpF and OMVs as efficient subunit vaccines against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infections in poultry farms. *Vaccine*, 38(45), 7094–7099. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.074>
- Li, Y., Yang, X., Zhang, H., Jia, H., Liu, X., Yu, B., Zeng, Y., Zhang, Y., Pei, X., & Yang, D. (2020). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in the commercial eggs in China. *International Journal of Food Microbiology*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108623>
- Luvsansharav, U. O., Vieira, A., Bennett, S., Huang, J., Healy, J. M., Hoekstra, R. M., Bruce, B. B., & Cole, D. (2020). *Salmonella* Serotypes: A Novel Measure of Association with Foodborne Transmission. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 151–155. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2641>
- Magdy, O. S., Moussa, M. I., Hussein, H. A., El-Hariri, M. D., Ghareeb, A., Hemeg, H. A., Al-Maary, K. S., Mubarak, A. S., Alwarhi, W. K., Eljakee, J. K., & Kabli, S. A. (2020). Genetic diversity of *Salmonella enterica* recovered from chickens farms and its potential transmission to humans. *Journal of Infection and Public Health*, 13(4), 571–576. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.09.007>
- Mendonça, B. S., de Oliveira, W. R., Pereira, R. S., Santos, L. R., Rodrigues, L. B., Dickel, E. L., Daroit, L., & Pilotto, F. (2021). Research Note: The use of ammonia gas for *Salmonella* control in poultry litters. *Poultry Science*, 100(1), 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.008>
- Parisi, A. A., Phuong, T. L. T., Mather, A. E., Jombart, T., Tuyen, H. T., Lan, N. P. H., Trang, N. H. T., Carrique-Mas, J., Campbell, J. I., Trung, N. V., Glass K., Kirk, M. D., & Baker, S. (2020). The role of animals as a source of antimicrobial resistant nontyphoidal *Salmonella* causing invasive and non-invasive human

- disease in Vietnam. *Infection, Genetics and Evolution*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104534>
- Qamar, A., Ismail, T., & Akhtar, S. (2020). Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in South Punjab-Pakistan. *PLoS One*, 15(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232382>
- Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., & Calero-Cáceres, W. (2020). Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1347–1354. <https://doi.org/10.1111/jam.14562>
- Santos, P. D. M., Widmer, K. W., & Rivera, W. L. (2020). PCR-based detection and serovar identification of *Salmonella* in retail meat collected from wet markets in Metro Manila, Philippines. *PLoS One*, 15(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239457>
- Shimajima, Y., Nishino, Y., Fukui, R., Kuroda, S., Suzuki, J., & Sadamasu, K. (2020). *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats in Tokyo, Japan and Their Antimicrobial Susceptibility. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 61(6), 211–217. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.61.211>
- Yang, J., Zhang, Z., Zhou, X., Cui, Y., Shi, C., & Shi, X. (2020). Prevalence and Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolates from Retail Foods in Shanghai, China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(1), 35–43. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2671>
- Xiaofan, J., & Ingmar, H. R. (2020). Biofilm Lithography enables high-resolution cell patterning via optogenetic adhesin expression. *National Academy of Sciences*, 14(115), 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720676115>