

Индикация биопленок микроорганизмов при болезнях органов пищеварения ягнят

Е. М. Ленченко¹, Н. П. Сачивкина², Д. А. Blumenкранц³, А. Ю. Арсенюк⁴

^{1,3} ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств» (ФГБОУ ВО «МГУПП»), г. Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), г. Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0003-2576-2020, e-mail: lenchenko-ekaterina@yandex.ru

² ORCID 0000-0003-1100-929X, e-mail: sachivkina@yandex.ru

³ ORCID 0000-0003-4724-6457, e-mail: blumenkrants@icloud.com

⁴ ORCID 0000-0002-8199-3045, e-mail: aarsenuk@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Приведены результаты морфометрических и денситометрических показателей биопленок микроорганизмов, выделенных при болезнях органов пищеварения ягнят. Установлены изменения количественного и видового состава микробиоценозов кишечника при болезнях органов пищеварения по сравнению с клинически здоровыми ягнятами. При проведении исследований методами оптической микроскопии выявили формирование трехмерной структуры биопленок в виде плотной сети, состоящей из грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжевых клеток, гифальных и псевдогифальных форм, окруженных межклеточным полимерным матриксом. Наличие бластоспор обуславливало увеличение количества адгезированных к субстрату клеток, происходило формирование биологической пленки, состоящей из палочковидных и округлых клеток, удерживающихся на клетках микроскопических грибов. В процессе дисперсии при разрушении межклеточного матрикса и отделении бактериальных и дрожжевых клеток от микроколоний обособлялись разветвленные структуры и колонизировали свободные от микроорганизмов участки субстрата. Оценку интенсивности формирования биопленок изучаемыми микроорганизмами проводили, измеряя оптическую плотность через 48 ч культивирования. Результаты люминесцентных микроскопических исследований показали, что динамика изменений жизнеспособных структур микроорганизмов характеризовалась чередующимися периодами снижения и увеличения интенсивности формирования биопленки. В исследуемых культурах микроорганизмов выявляли клетки, характеризующиеся способностью к активному росту и размножению, образующие сменяющие друг друга субпопуляции. При детекции жизнеспособности микроорганизмов в составе биопленок дифференцировали жизнеспособные (зеленый спектр люминесценции) и нежизнеспособные клетки (красный спектр люминесценции).

Ключевые слова: Адгезия, биопленки, бактерии, дисперсия, микроскопические грибы, колонизационная резистентность, межклеточный матрикс, люминесценция.

Благодарность: Авторы благодарят Московский государственный университет пищевых производств (МГУПП) и Российский университет дружбы народов (РУДН) за предоставленные возможности для проведения исследовательской работы.

Для цитирования: Ленченко Е. М., Сачивкина Н. П., Blumenкранц Д. А., Арсенюк А. Ю. Индикация биопленок микроорганизмов при болезнях органов пищеварения ягнят. *Ветеринария сегодня*. 2021; 1 (36): 59–67. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-59-67.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Ленченко Екатерина Михайловна, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «МГУПП», 125080, Россия, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11, e-mail: lenchenko-ekaterina@yandex.ru.

UDC 619:579.62:636.32/.38.053.2:616.3

Visualization of microbial biofilms in case of digestive disorders in lambs

E. M. Lenchenko¹, N. P. Sachivkina², D. A. Blumenkrants³, A. Yu. Arsenyuk⁴

^{1,3} Moscow State University of Food Production (FGBOU VO MGUPP), Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

⁴ FGBI "The Russian State Centre for Animal Feed and Drug Standardization and Quality" (FGBI "VGNKI"), Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0003-2576-2020, e-mail: lenchenko-ekaterina@yandex.ru

² ORCID 0000-0003-1100-929X, e-mail: sachivkina@yandex.ru

³ ORCID 0000-0003-4724-6457, e-mail: blumenkrants@icloud.com

⁴ ORCID 0000-0002-8199-3045, e-mail: aarsenuk@gmail.com

SUMMARY

The paper demonstrates morphometric and densitometric parameters of microbial biofilms recovered from lambs with digestive disorders. Changes of quantitative and species composition of the intestinal microbiocenoses in the lambs with digestive disorders were compared with the ones of the clinically healthy lambs. Light microscopy results demonstrated formation of three-dimensional biofilm structure in the form of dense grid consisting of gram-negative and gram-positive bacteria, yeast cells, hyphae and pseudohyphae surrounded with intracellular polymer matrix. Presence of blastospores aided to the increased number of cells attached to the substrate, and biofilm was formed, which consisted of rod and round cells attached to the microfungi cells. In the process of dispersion that occurred during the destruction of the intercellular matrix and bacterial and yeast cell detachment, branched structures separated from the microcolonies and colonized microorganism-free regions of the substrate. The intensity of biofilm formation by the microorganisms under study was evaluated by optic density measurement in 48 hours of cultivation. Fluorescence microscopy results demonstrated that the dynamics of changes of the viable microbial structures was specified by intermittent periods of increased or decreased biofilm formation intensity. Cells characterized by active growth and replication and forming alternating subpopulations were detected in the examined microbial cultures. When determining the viability of the microorganisms in the biofilms, the viable (green fluorescence) and non-viable (red fluorescence) cells were differentiated.

Keywords: Attachment, biofilms, bacteria, dispersion, microfungi, colonization resistance, intercellular matrix, fluorescence.

Acknowledgements: The authors are grateful to the Moscow State University of Food Production (FGBOU VO MGUPP) and Peoples' Friendship University of Russia (RUDN) for provided opportunity to perform the research activities.

For citation: Lenchenko E. M., Sachivkina N. P., Blumenkrants D. A., Arsenyuk A. Yu. Visualization of microbial biofilms in case of digestive disorders in lambs. *Veterinary Science Today*. 2021; 1 (36): 59–67. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-59-67.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Ekaterina M. Lenchenko, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Department of Veterinary Medicine, Moscow State University of Food Production, 125080, Russia, Moscow, Volokolamskoye Shosse, 11, e-mail: lenchenko-ekaterina@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Совокупность процессов циркуляции и резервации микроорганизмов в почвенных и водных биоценозах окружающей среды является экологической основой возникновения энзоотий, а также формирования очагов и распространения возбудителей инфекционных заболеваний на новые территории или акватории [1–2].

В структуре неонатальной патологии желудочно-кишечные и респираторные болезни составляют до 95,0%, этиологическим фактором которых являются *Salmonella* spp. и *Pasteurella* spp. [3]. При патологиях, клинически проявляющихся диареей, дегидратацией, токсемией, в частности при эшерихиозе, заболеваемость ягнят достигает 12,3–95,2%, летальность – 60,0–90,0% [4, 5]. В биотопах кишечника ягнят молозивного и молочного периодов наблюдали снижение концентрации бифидо- и лактобактерий и увеличение содержания токсигенных энтеробактерий, энтерококков и микроскопических грибов рода *Candida* [6–11]. Колонизация тонкого кишечника патогенными микроорганизмами, прежде всего грамотрицательными энтеробактериями, обусловлена морфофункциональными особенностями органов пищеварения животных раннего постнатального периода развития [12–14].

Наблюдается инцидентность резистентности к лекарственным препаратам микроорганизмов, выделенных из патологического материала и содержащего гнойных кожно-мышечных повреждений животных [15–18].

Контаминация микроорганизмами, обладающими высокой ферментативной активностью, в том числе при низких температурах, может происходить на всех технологических стадиях обработки и хранения пище-

вого сырья, что обуславливает социальную значимость проблемы [12, 19, 20].

Патогенез синдрома избыточного бактериального роста при транслокации микроорганизмов, реализации факторов вирулентности микроорганизмов обеспечивается адгезивными свойствами, являющимися одним из ключевых факторов при формировании архитектурной биопленки, характеризующихся увеличением оптической плотности, обуславливая длительность и ретроспективность диагностических исследований [21–23]. В биопленках полирезистентных штаммов *Candida parapsilosis* выявляли процессы диссоциации, денситометрические показатели концентрического фенотипа в 1,75 раза превышали показатели оптической плотности фенотипа формы «кратера вулкана», показатели оптической плотности гладких колоний были на 20,0–60,0% меньше по сравнению с другими фенотипами [24]. Популяции, подвергавшиеся воздействию неблагоприятных факторов, являлись гетерогенными, причем генетически не отличались от исходной популяции, сохраняли физиологическое разнообразие, необходимое для колонизации «очищенной» ниши или новой среды обитания [21, 23, 25, 27].

Для детекции жизнеспособных микроорганизмов в составе гетерогенной популяции *in vitro* и *in vivo* установлена эффективность инструментальных способов, позволяющих выявить полисахаридный межклеточный матрикс и метаболически активные клетки за счет взаимодействия красителей с полисахаридами клеточной стенки [28–30].

Фазово-контрастная микроскопия позволяет выявить показатель агрегации подвижных клеток, процессы агрегации клеток, оценить степень прироста биомассы

биофленок на различных этапах формирования в зависимости от состава и содержания кислорода в среде культивирования [31]. Электронно-микроскопические исследования биофленок грамотрицательных, грамположительных бактерий и микроскопических грибов позволяют раскрыть механизмы межклеточной коммуникации, сорбции и агрегации гетерогенных биофленок, циклические режимы роста, фенотипическую пластичность, обуславливающих персистенцию некультивируемых микроорганизмов в организме бактерионосителей в межэпизоотические периоды [12, 21, 23, 32].

Для раскрытия механизмов адаптации патогенов к паразитированию в организме восприимчивых видов, оптимизации схемы микробиологических исследований, разработки противоэпизоотических мероприятий, направленных на предупреждение заболеваний животных и получение безопасных продуктов животноводства, приоритетным направлением научных изысканий является апробация и подбор способов и методов исследований биофленок микроорганизмов, что и определило актуальность темы исследований.

Цель работы – изучить морфометрические и денситометрические показатели биофленок микроорганизмов при болезнях органов пищеварения ягнят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы. В опытах использовали изоляты, выделенные из содержимого кишечника ягнят агинской породы в возрасте от 1 до 30 суток. Перед проведением исследований животных по принципу аналогов разделили на две группы: I – при болезнях органов пищеварения (опыт, $n = 5$); II – клинически здоровые ягнята (контроль, $n = 5$).

Питательные среды: сердечно-мозговой бульон, Chromocult® Coliform Agar, Cetrimide Agar, Yolk Salt Agar, HiCrome Candida Agar, Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar, (HiMedia, Индия).

Тест-системы: ENTERO-Rapid, NEFERM test 24 (Erba-Lachema, Чехия), API Staph (bioMérieux, Франция), HiCandida Identification Kit (HiMedia, Индия).

Диагностические сыворотки: ФГП «Армавирская биофабрика» (Россия), РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселского» (Беларусь).

Индикация и идентификация микроорганизмов. Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств микроорганизмов проводили общепринятыми методами в соответствии с Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984–1989) и «Определителем патогенных и условно-патогенных грибов» [33, 34]. Микроорганизмы культивировали при 37 °C в течение 24 ч, применяя жидкие и плотные питательные среды. Серологическую идентификацию эшерихий проводили диагностическими сыворотками, определяли адгезивные антигены K88, K99, 987P, F41, A20 в соответствии с рекомендациями «Наставления по применению агглютинирующих О-копи сывороток» (Москва, 1998).

Денситометрические показатели биофленок. Индикацию биофленок микроорганизмов проводили по степени связывания кристаллического фиолетового (HiMedia, Индия) при длине волны 490 нм. Исследуемые образцы вносили в лунки 96-луночного планшета (ОАО «Фирма Медполимер», Россия), культивировали 48 ч в статических аэробных условиях при 37 °C. Затем жидкость удаляли, лунки планшетов трижды промывали 200 мкл фосфатно-буферного раствора (pH 7,3).

На каждой стадии промывки планшеты встряхивали в течение 5 мин. Фиксацию производили 150 мкл 96%-го этанола в течение 15 мин, подсушивали 20 мин при 37 °C. Для окрашивания биофленок микроорганизмов в лунки вносили 0,5%-й раствор красителя и культивировали 5 мин при 37 °C. Содержимое лунок удаляли, трижды промывали 200 мкл фосфатно-буферного раствора (pH 7,3) и подсушивали. Связавшийся краситель элюировали из адгезированных клеток 200 мкл 96%-го этанола в течение 30 мин [35, 36].

Морфометрические показатели биофленок. Для оптической микроскопии микроорганизмы культивировали 18–48 ч при 37 °C на покровных стеклах, размещенных в чашках Петри с 20 мл мясопептонного бульона (МПБ) и 5 мл взвеси 18-часовых культур в концентрации 10^5 КОЕ/мл [21]. Препараты фиксировали смесью спирта с эфиром (1:1) 10 мин, окрашивали 0,5%-м раствором метиленового синего, водным раствором генцианвиолета в разведении 1:2000, с помощью набора для окраски по Граму («БиоВитрум», Россия). Для люминесцентной микроскопии использовали покровные стекла 18,0 × 18,0 мм (Corning Inc., США). Перед инокуляцией стекла промывали 70%-м этанолом в деионизированной воде, подсушивали при 70 °C в течение 30 мин. Покровные стекла помещали в лунки 12-луночных планшетов (ОАО «Фирма Медполимер», Россия), пипеткой наносили на их поверхность суспензию микроорганизмов ($OD_{600} = 0,08$) в объеме 5,0 мл на лунку и культивировали при 37 °C в течение 18–48 ч. Лунки планшета дважды промывали фосфатно-буферным раствором (pH 7,2) и подсушивали. Затем на поверхность стекла наносили 15 мкл красителя Live/Dead (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1 мг/мл, покрывали покровным стеклом, окрашивали 10 мин при 25 °C в темноте [37]. Микроскопические исследования проводили при репрезентативной выборке достоверной частоты встречаемости – $\geq 90,0\%$ поля зрения оптического микроскопа «Биомед МС-1» (ООО «Биомед», Россия); люминесцентного микроскопа Leica DMRB (Германия), оборудованного 100-кратным масляным иммерсионным объективом с дихроичным фильтром возбуждения длинной волны 510 нм и фильтром длинных частот 515 нм.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индикация и идентификация микроорганизмов. При болезнях органов пищеварения ягнят наблюдали увеличение количественного состава бактерий и дрожжеподобных грибов, формирующих колонии на дифференциально-диагностических средах: Chromocult® Coliform Agar, Cetrimide Agar, Yolk Salt Agar, HiCrome Candida Agar (табл. 1).

На указанных питательных средах наблюдали увеличение количества микроорганизмов, выделенных при болезнях органов пищеварения ягнят (опыт), по сравнению с клинически здоровыми животными (контроль).

На среде Chromocult® Coliform Agar за счет наличия в составе среды додецилсульфата натрия подавлялся рост грамположительных бактерий, наблюдался рост грамотрицательных бактерий: опыт – $7,15 \pm 0,12$ – $9,33 \pm 0,26$; контроль – $3,13 \pm 0,12$ – $7,13 \pm 0,10$; индекс колонизации составил 0,831%.

Таблица 1

Количественный состав микроорганизмов при болезнях органов пищеварения

Table 1

Quantitative composition of microorganisms in case of digestive disorders

Среды	Количество микроорганизмов (КОЕ, Ig/g)		Индекс колонизации*, %
	Контроль	Опыт	
Chromocult® Coliform Agar ($n = 20$)	$3,13 \pm 0,12 - 7,13 \pm 0,10$	$7,15 \pm 0,12 - 9,33 \pm 0,26$	0,831
Cetrimide Agar ($n = 6$)	$1,01 \pm 0,12 - 2,01 \pm 0,10$	$2,84 \pm 0,11 - 3,03 \pm 0,16$	0,356
Yolk Salt Agar ($n = 6$)	$0,21 \pm 0,11 - 0,82 \pm 0,10$	$0,83 \pm 0,07 - 1,36 \pm 0,09$	0,253
HiCrome Candida Agar ($n = 6$)	$1,74 \pm 0,13 - 2,18 \pm 0,03$	$4,14 \pm 0,12 - 5,01 \pm 0,08$	0,420

* Отношение количества микроорганизмов (КОЕ, Ig/g) в 1,0 г исследуемого материала клинически здоровых животных (контроль) и количества микроорганизмов (КОЕ, Ig/g) в 1,0 г исследуемого материала при болезнях органов пищеварения (опыт).

* Proportion of microorganisms (CFU, Ig/g) in 1.0 g of the tested sample collected from clinically healthy animals (control) and microorganisms (CFU, Ig/g) in 1.0 g of the tested sample collected from the animals with digestive disorders (experimental).

При дифференциации микроорганизмов учитывали, что на указанной дифференциально-диагностической среде эшерихии, в связи с наличием ферментов β -галактозидазы и β -глюкуронидазы, расщепляющих одновременно два хромогенных субстрата, формировали фиолетового цвета колонии. Протеи и энтеробактеры, не имеющие указанных ферментов, формировали на среде бесцветные колонии. Клебсиеллы за счет расщепления ферментом β -галактозидазы хромогенного субстрата формировали колонии темно-розового цвета (рис. 1а).

Наличие триптофана в составе среды позволяло провести тест на образование индола, для этого на фиолетовые колонии наносили каплю реактива Ковача. При изменении цвета колоний до розово-красного в течение 3–5 сек тест считали положительным, что

позволило дифференцировать эшерихии от таксономически сходных видов энтеробактерий в течение 24 ч.

Энтеробактерии были каталазаположительные, оксидазаотрицательные, ферментирующие D-глюкозу и многоатомные спирты с образованием кислоты и газа. Эшерихии образовывали индол, утилизировали ацетат натрия, не образовывали сероводород, не утилизировали цитрат, малонат натрия, не продуцировали уреазу, фенилаланиндезаминазу, ферментировали сахарозу и дульцит. Клебсиеллы утилизировали глюкозу, цитрат натрия, продуцировали ацетилметилкарбинол, ферментировали инозит, гидролизировали мочевины, не образовывали индол, сероводород. Протеи образовывали сероводород, уреазу, редуцировали нитраты, гидролизировали желатин, ферментировали глюкозу,

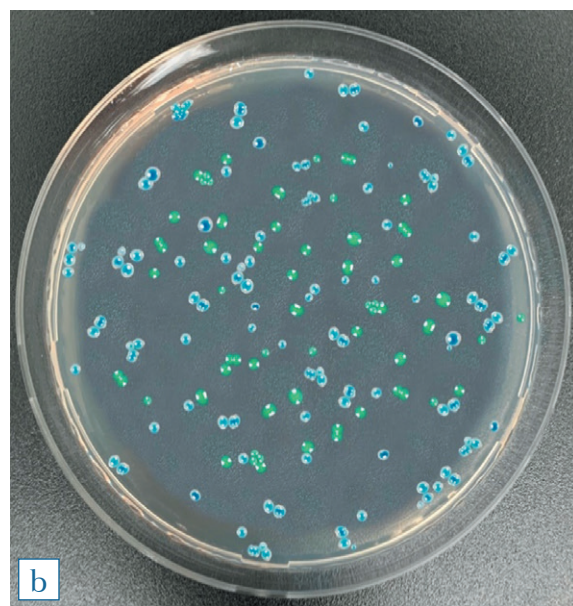
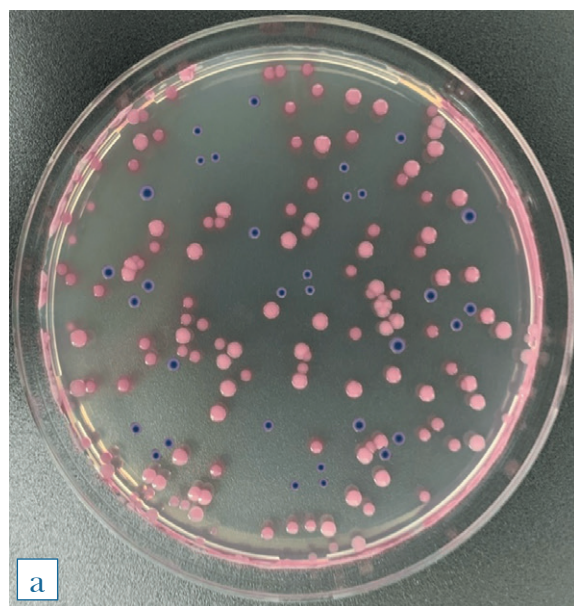


Рис. 1. Морфология колоний микроорганизмов микробиоценозов кишечника ягнят при болезнях органов пищеварения (рост при 37 °C, 48 ч):

а – Chromocult® Coliform Agar, 76×10^{-9} КОЕ; б – HiCrome Candida Agar, 68×10^{-9} КОЕ

Fig. 1 Morphology of microbial colonies in intestinal microbiocenes of lambs with digestive disorders:

а – Chromocult® Coliform Agar, 76×10^{-9} CFU; б – HiCrome Candida Agar, 68×10^{-9} CFU

давали положительную реакцию с метиловым красным, дезаминировали фенилаланин, не декарбоксилировали лизин, различались по способности утилизировать цитрат натрия. Энтеробактерии не образовывали индол и сероводород, ферментировали глюкозу, лактозу, рамнозу, ксилозу, мальтозу, сорбит, арабинозу, рафинозу, утилизировали цитрат, малонат натрия, гидролизировали желатин, различались по способности утилизировать инозит, дульцит, салицин, адонит (табл. 2).

При учете дифференциальных признаков из 20 выделенных грамотрицательных чистых культур микроорганизмов было идентифицировано 19 (95,0%) изолятов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, из них 13 (65,0%) составили *Escherichia coli*, 4 (20,0%) – *Klebsiella pneumoniae*, 2 (10,0%) – *Proteus vulgaris*, 1 (5,0%) – *Enterobacter cloacae*.

При определении серологической принадлежности из 13 (65,0%) идентифицированных изолятов *E. coli* 3 (15,0%) положительно реагировали с поливалентной сывороткой группы № 1 (серогруппы O2, O78, O33); 4 (20,0%) – с сывороткой группы № 2 (серогруппы O9, O15, O26, O111), 2 (10,0%) – с сывороткой группы № 3. Четыре культуры микроорганизмов продуцировали адгезивные антигены: O33:F41 – 1 (5,0%), O111:A20 – 1 (5,0%), O2:A20 – 1 (5,0%), O9:A20 – 1 (5,0%).

Увеличение количества микроорганизмов при болезнях органов пищеварения наблюдали также и на среде Cetrimide Agar: опыт – $2,84 \pm 0,11$ – $3,03 \pm 0,16$; контроль – $1,01 \pm 0,12$ – $2,01 \pm 0,10$; индекс колонизации – 0,356%. Из 6 выделенных микроорганизмов идентифицирован 1 изолят (16,7%) грамотрицательных аэробных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Указанные бактерии восстанавливали нитриты в нитраты, обладали протеолитической активностью (разжижали желатин и свернутую кровяную сыворотку, гидролизировали казеин), свертывали лакмусовое молоко и расщепляли сгусток, не ферментировали мальтозу, не образовали индол и сероводород.

Количество микроорганизмов увеличивалось и на среде Yolk Salt Agar, содержащей 10,0% натрия хлорида: опыт – $0,83 \pm 0,07$ – $1,36 \pm 0,09$; контроль – $0,21 \pm 0,11$ – $0,82 \pm 0,10$; индекс колонизации – 0,253%. Из 6 выделенных микроорганизмов идентифицировали 2 изолята (33,3%) грамположительных бактерий *Staphylococcus* spp.: *S. aureus* – 1 (16,7%), *S. epidermidis* – 1 (16,7%). Указанные бактерии формировали выпуклые непрозрачные колонии белого, золотистого, оранжевого, желтого цветов диаметром 2,0–2,5 мм. Отмечали наличие плазмокоагуляции сыворотки крови, содержащей 1,0–4,0% цитрата натрия, с образованием на предметном стекле сгустка, наблюдали рост в присутствии 15,0% хлорида натрия или 40,0% желчи. Микроорганизмы ферментировали глюкозу, маннит в анаэробных условиях, продуцировали аммиак, свертывали и пептонизировали молоко, не ферментировали дульцит, салицин, инулин.

Количество колоний микроорганизмов на среде HiCrome Candida Agar также увеличивалось: опыт – $4,14 \pm 0,12$ – $5,01 \pm 0,08$; контроль – $1,74 \pm 0,13$ – $2,18 \pm 0,03$; индекс колонизации – 0,420%. Из 6 выделенных микроорганизмов идентифицировали 3 изолята (50,0%) дрожжеподобных грибов: *Candida albicans* – 2 (33,3%), *Candida parapsilosis* – 1 (16,7%). Микроорганизмы на агаре Сабуро с глюкозой формировали гладкие, выпуклые, белого цвета, мягкой равномерной консистенции колонии (S-форма). На хромогенной среде микроскопические грибы *C. albicans* за счет расщепления ферментом β -N-ацетилгалактозаминидазы

Таблица 2

Дифференциация энтеробактерий по биохимическим свойствам

Table 2

Differentiation of enterobacteria by their biochemical properties

Биохимические признаки	Вид бактерий			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Оксидаза	–	–	–	–
Каталаза	+	+	+	+
Лактоза	+	+	–	+
Индол	+	–	+	–
Сорбит	+	+	–	+
Сероводород	–	–	+	–
Цитрат	–	+	+	+
Мочевина	–	+	+	–
Желатин	–	–	+	+
Реакция Фогеса – Проскауэра	–	+	+	+

«+» – положительный тест (positive test result);

«–» – отрицательный тест (negative test result).

Таблица 3

Дифференциация дрожжеподобных грибов *Candida* spp. по биохимическим свойствам

Table 3

Differentiation of yeast-like fungi *Candida* spp. by their biochemical properties

Углеводы	Вид микроорганизмов	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Уреаза	–	–
Мелибиоза	–	–
Лактоза	–	–
Мальтоза	+	+
Сахароза	+	+
Галактоза	+	–
Целлобиоза	–	–
Инозит	–	–
Ксилоза	+	+
Дульцит	–	–
Рафиноза	–	–
Трегалоза	+	–

«+» – положительный тест (positive test result);

«–» – отрицательный тест (negative test result).

хромогенного гексаамидазного субстрата образовали колонии светло-зеленого цвета. Колонии *C. parapsilosis*, не имеющие указанного фермента, формировали на среде синие колонии (рис. 1b).

Таблица 4

Оценка интенсивности формирования биопленок бактериями по оптической плотности

Table 4

Determination of the bacterial biofilm formation intensity by optic density

Культуры микроорганизмов	Размеры клеток, нм	Оптическая плотность				
		OD _s			OD _c	t _d
		1	2	3		
<i>E. coli</i>	(1,4–3,8) × (0,5–0,8)	0,542	0,571	0,550	0,098	4,2
<i>K. pneumoniae</i>	(0,6–6,0) × (0,3–1,0)	0,514	0,493	0,502	0,099	4,4
<i>P. vulgaris</i>	(1,0–3,0) × (0,4–0,8)	0,284	0,279	0,275	0,097	4,2
<i>E. cloacae</i>	(0,6–1,0) × (1,2–3,0)	0,246	0,256	0,267	0,099	3,6
<i>P. aeruginosa</i>	(1,5–5,0) × (0,5–1,4)	0,458	0,462	0,454	0,098	3,9
<i>S. aureus</i>	(1,5–1,6)	0,481	0,485	0,477	0,098	4,4
<i>C. albicans</i>	(2,0–3,0) × (3,0–5,0)	0,520	0,532	0,526	0,099	4,5
<i>C. parapsilosis</i>	(1,7–2,0) × (3,0–4,0)	0,391	0,397	0,403	0,097	4,2

OD_s – исследуемый образец (tested sample); OD_c – контроль (control); t_d – коэффициент достоверности (confidence factor).

Дрожжеподобные грибы *Candida* spp. были способны расти в присутствии циклогексимида, сбраживали сахарозу, мальтозу, ксилозу, уреазной активностью не обладали. Микроорганизмы *C. albicans* сбраживали галактозу, *C. parapsilosis* не сбраживали трегалозу (табл. 3).

Денситометрические показатели биопленок микроорганизмов. Распределение изученных видов микроорганизмов по интенсивности формирования биопленки проводили согласно измерениям оптической плотности через 48 ч культивирования.

Согласно полученным результатам, значения абсолютных величин оптической плотности (OD_s) *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* составили 0,454 ± 0,09 – 0,526 ± 0,08, интенсивность формирования биопленок – I ≥ 0,3–0,4, следовательно, данные культуры являются сильными продуцентами биопленок.

При выявлении способности к образованию биопленки у культур *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. parapsilosis* определили, что оптическая плотность (OD_s) была в диапазоне 0,391 ± 0,07 – 0,571 ± 0,05, интенсивность

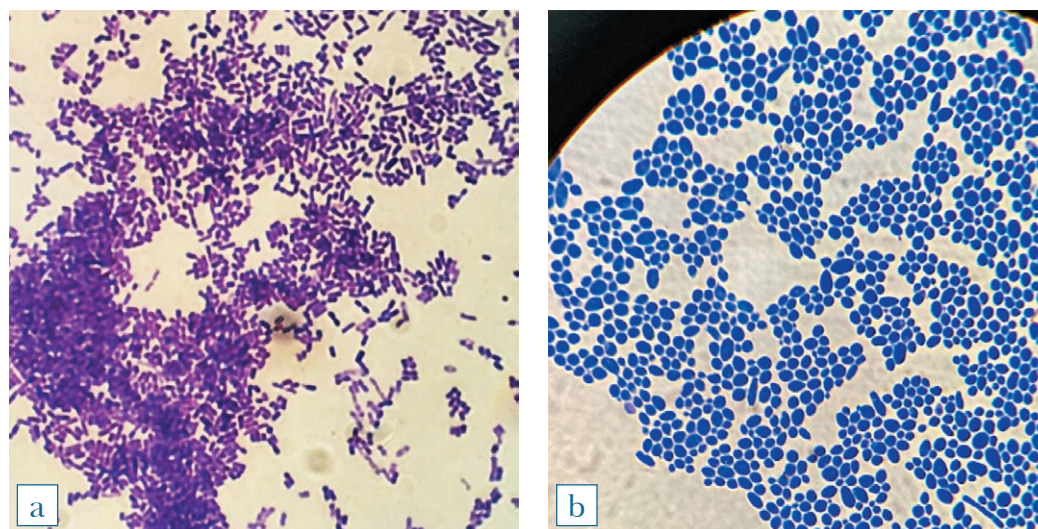


Рис. 2. Морфология биопленок микроорганизмов (рост при 37 °С, 48 ч, МПБ):

а – бактерии *K. pneumoniae*. Окрашивание метиленовым синим, ок. 10, об. 100, иммерсия;б – дрожжеподобные грибы *C. parapsilosis*. Окрашивание метиленовым синим, ок. 10, об. 100, иммерсия

Fig. 2. Morphology of microbial biofilms (growth at 37 °C, 48 hours, MPB):

а – *K. pneumoniae* bacteria. Staining with methylene blue, oc. 10, obj. 100, immersion;б – yeast-like fungi *C. parapsilosis*. Staining with methylene blue, oc. 10, obj. 100, immersion

формирования биопленок – $I \geq 0,2-0,3$. Таким образом, данные микроорганизмы были отнесены к группе умеренных продуцентов биопленок.

Установлено, что микроорганизмы *P. vulgaris*, *E. cloacae* обладали слабой способностью образовывать биопленку: оптическая плотность (OD_{540}) – $0,246 \pm 0,03 - 0,284 \pm 0,08$, интенсивность формирования биопленок – $I \geq 0,1-0,2$ (табл. 4).

Морфометрические показатели биопленок микроорганизмов. Через 18–48 ч культивирования при 37 °C с помощью оптической микроскопии препаратов, окрашенных генцианвиолетом, метиленовой синью и по Граму, были выявлены гетерогенные структуры биопленок изученных изолятов грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также дрожжеподобных грибов *Candida* spp. (рис. 2).

Реализация процессов межклеточной коммуникации происходила поэтапно: седиментация (оседание); фиксация (первичное прикрепление); формирование монослоя, межклеточных связей (коагрегация), рост микроколоний; формирование кластеров и архитектуры зрелых биопленок; дисперсия.

При разрушении межклеточного матрикса и отделении бактериальных и дрожжевых клеток от микроколоний дисперсия выявлялась в виде обособленных разветвленных структур, колонизирующих свободные от микроорганизмов участки субстрата.

Формирование трехмерной структуры биопленок в виде плотной сети, состоящей из грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжевых клеток, гифальных и псевдогифальных форм, происходит за счет синтеза межклеточного полимерного матрикса. Как правило, в поливидовых биопленках наблюдали адгезию грамотрицательных и грамположительных бактерий к дрожжевым формам микроскопических грибов. Наличие бластоспор микроскопических грибов обуславливало увеличение количества адгезированных к субстрату клеток, формировались биопленки, состоящие из бактериальных клеток, удерживающихся на дрожжевых клетках (рис. 3).

При люминесцентной микроскопии через 18–72 ч культивирования динамика изменений жизнеспособных структур характеризовалась чередующимися периодами снижения и увеличения интенсивности формирования биопленок. В исследуемых культурах микроорганизмов выявляли клетки, характеризующиеся способностью к активному росту и размножению, образующие сменяющие друг друга субпопуляции. Смена периодов интенсивности роста микроорганизмов обусловлена наличием различных диссоциативных вариантов, получающих преимущество при формировании архитектуры биопленок. За счет взаимодействия флуоресцентных красителей с полисахаридами клеточной стенки в составе биопленок дифференцировали структуры метаболически активных клеток: зеленый спектр люминесценции – жизнеспособные клетки и красный – нежизнеспособные клетки (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При болезнях органов пищеварения ягнят из 38 выделенных микроорганизмов было идентифицировано 26 изолятов, в том числе: *Escherichia coli* – 13, *Klebsiella pneumoniae* – 4, *Proteus vulgaris* – 2, *Enterobacter cloacae* – 1, *Pseudomonas aeruginosa* – 1, *Staphylococcus*

aureus – 1, *Staphylococcus epidermidis* – 1, *Candida albicans* – 2, *Candida parapsilosis* – 1.

Через 18–48 ч культивирования при 37 °C с помощью оптической микроскопии выявили формирования гетерогенной структуры биопленок изученных изолятов грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также дрожжеподобных грибов *Candida* spp.

За счет взаимодействия флуоресцентных красителей с полисахаридами клеточной стенки в составе биопленок дифференцировали структуры метаболически активных клеток: зеленый спектр люминесценции – жизнеспособные клетки и красный – нежизнеспособные клетки.

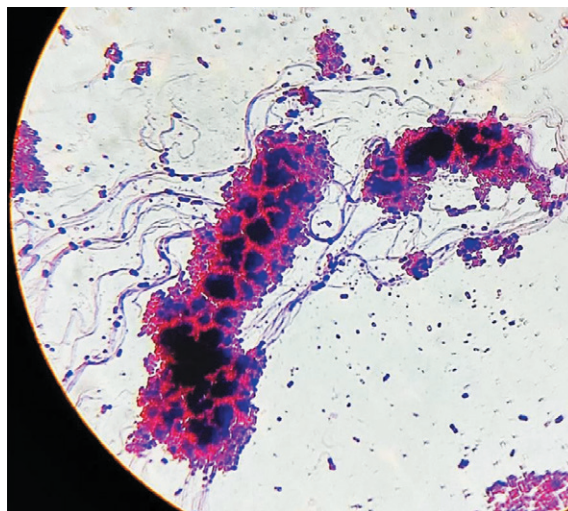


Рис. 3. Морфология биопленок микроорганизмов (рост при 37 °C, 48 ч, МПБ): бактерии *P. aeruginosa* и дрожжеподобные грибы *C. albicans*.

Окрашивание по Граму, ок. 10, об. 100, иммерсия

Fig. 3. Morphology of microbial biofilms (growth at 37 °C, 48 hours, MPB):

P. aeruginosa bacteria and yeast-like fungi *C. albicans*. Gram staining, oc. 10, obj. 100, immersion

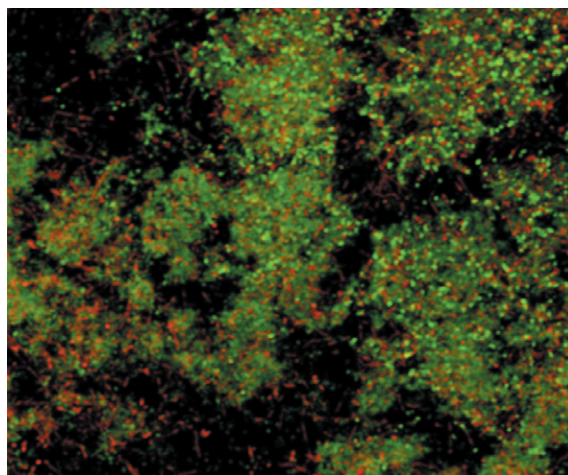


Рис. 4. Морфология биопленок бактерий *K. pneumoniae* (рост при 37 °C, 72 ч, МПБ). Комплекс красителей Live/Dead, ок. 10, об. 200, иммерсия

Fig. 4. Morphology of *K. pneumoniae* biofilms (growth at 37 °C, 72 hours, MPB).

Live/Dead stains, oc. 10, obj. 200, immersion

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 5, 11, 17, 18, 23–25, 27–29, 32, 33, 35–37 см. REFERENCES)

- Джупина С. И. Эпизоотический процесс и его контроль при факторных инфекционных болезнях. М.: РУДН; 2002. 70 с. Режим доступа: <https://ru1lib.org/ireader/3083115>.
- Макаров В. В. Факторные болезни. *Российский ветеринарный журнал*. 2017; 4: 22–27. eLIBRARY ID: 29188056.
- Прунтова О. В., Русалеев В. С., Гневашев В. М., Селиверстов В. В., Потехин А. В., Колотилова Т. Г. Антигенная активность бактерий *Salmonella choleraesuis* и *Pasteurella multocida* в ассоциированной вакцине при инактикации димером этиленimina. *Сельскохозяйственная биология*. 2003; 38 (6): 94–99. eLIBRARY ID: 18100818.
- Гнездилова Л. А. Эпизоотологическая характеристика, диагностика и профилактика смешанных инфекций овец с синдромом поражения репродуктивных органов: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. М.; 2005. 32 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01003254498#?page=1>.
- Усачев И. И. Микробиоценоз кишечника, его оценка и контроль у овец, целенаправленное формирование у новорожденных ягнят: дис. ... д-ра вет. наук. М.; 2014. 368 с. Режим доступа: <http://viev.ru/wordpress/wp-content/uploads/2015/01/Dissertacija-Usachev-I-I.pdf>.
- Ленченко Е. М., Мансурова Е. А., Моторыгин А. В. Характеристика токсигенности энтеробактерий, выделенных при желудочно-кишечных болезнях сельскохозяйственных животных. *Сельскохозяйственная биология*. 2014; 49 (2): 94–104. DOI: 10.15389/agrobology.2014.2.94rus.
- Шамукова Д. Ф., Яковлева А. М., Сачивкина Н. П. Морфология грибов рода *Candida* и вопросы дифференциальной диагностики у собак и кошек. *Инновационные процессы в АПК: сборник статей VI Международной научно-практической конференции преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов*. М.: РУДН; 2014; 201–203. eLIBRARY ID: 24406937.
- Пирожков М. К., Ленева С. В., Викторова Е. В., Стрельченко С. А., Тихонов Л. И., Скляр О. Д. Диагностика, специфическая профилактика и лечение при бактериальных болезнях животных. *Ветеринария*. 2011; 1: 24–28. eLIBRARY ID: 15577882.
- Курятова Е. В., Герасимова М. В., Тюкавкина О. Н., Гаврилов Ю. А., Гаврилова Г. А. Этиология возникновения гастроэнтеритов молодяка сельскохозяйственных животных в условиях Амурской области. *Дальневосточный аграрный вестник*. 2018; 1 (45): 60–66. DOI: 10.24411/1999-6837-2018-11010.
- Ленченко Е. М. Биология и экология иерсиний – возбудителей пищевых токсикоинфекций: дис. ... д-ра вет. наук. М.; 2000. 382 с.
- Клеменов А. В., Мартынов В. Л., Торгушина Н. С. Первичная недостаточность баугиниевой заслонки как висцеральный фенотипический маркер дисплазии соединительной ткани. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2008; 2: 83–86. eLIBRARY ID: 15287251.
- Агарков Н. В. Макро- и микроморфология слепой кишки и ее кровеносного русла овец северокавказской породы в постнатальном онтогенезе: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь; 2018. 23 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01008708014#?page=1>.
- Плешакова В. И., Колотилова А. Н., Лещева Н. А. Факторы патогенности микроорганизмов, выделенных из питьевой воды и биопленки технологический элементов систем водоснабжения сельскохозяйственных предприятий. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; 1: 476. eLIBRARY ID: 18829425. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8337>.
- Сахно Н. В., Тимохин О. В., Сахно О. Н. Совершенствование метода культивирования микроорганизмов. *Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса*. 2014; 1 (18): 45–47. eLIBRARY ID: 22369389. Режим доступа: http://www.nitu.ru/tpaprk/14_1.pdf.
- Прунтова О. В., Шадрова Н. Б. Современные методы определения микробиологической порчи пищевых продуктов и сырья (аналитический обзор). *Ветеринария сегодня*. 2017; 2: 27–33. Режим доступа: <https://veterinary.aria.ru/jour/article/view/300>.
- Ермоленко З. М., Фурсова Н. К. Микробиологическая порча пищевых продуктов и перспективные направления борьбы с этим явлением. *Бактериология*. 2018; 3 (3): 46–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-46-57.
- Ленченко Е. М. Морфофункциональные свойства и популяционная изменчивость иерсиний, поражающих сельскохозяйственных животных, в зависимости от температурного фактора. *Сельскохозяйственная биология*. 1996; 6: 88–95.
- Милько Е. С., Красильникова Е. Н., Милько Д. М. Значение гетерогенности популяции бактерий, создаваемой процессом диссоциации, для роста пурпурных фотосинтезирующих бактерий в естественных местах их обитания. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2016; 3: 55–59. Режим доступа: <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/344/0>.
- Пахомов Ю. Д. Получение, детекция и характеристика некультивируемых клеток бактерий: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.; 2013. 23 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01005537423#?page=1>.
- Ленченко Е. М., Сачивкина Н. П. Исследование биопленок и фенотипических признаков грибов рода *Candida*. *Ветеринария сегодня*. 2020; 2: 132–138. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-132-138.
- Филиппева Ю. А., Телешева Е. М., Евстигнеева С. С., Шелудько А. В., Пономарева Е. Г., Петрова Л. П., Кацы Е. И. О вкладе агрегации клеток и экстраклеточной ДНК в формирование и стабилизацию биопленок бактерий *Azospirillum brasilense*. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2018; 18 (4): 399–406. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406.
- Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов: пер. с англ. К. Л. Тарасова, Ю. Н. Ковалева; под ред. И. Р. Дорожковой. М.: Мир; 2001. 468 с.

REFERENCES

- Dzhupina S. I. Epidemic process and its control in case of factor infectious diseases [Epizooticheskij process i ego kontrol' pri faktornyh infekcionnyh boleznyah]. M.: RUDN University; 2002. 70 p. Available at: <https://ru1lib.org/ireader/3083115>. (in Russian)
- Makarov V. V. Factor diseases. *Russian Veterinary Journal*. 2017; 4: 22–27. eLIBRARY ID: 29188056. (in Russian)
- Prunтова O. V., Rusaleev V. S., Gnevashchev V. M., Seliverstov V. V., Potekhin A. V., Kolotilova T. G. Antigenic activity of *Salmonella choleraesuis* and *Pasteurella multocida* in associated vaccine inactivated by ethylene imine dimer. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*. 2003; 38 (6): 94–99. eLIBRARY ID: 18100818. (in Russian)
- Gnezdilova L. A. Epidemic properties, diagnosis and prevention of mixed ovine infections involving reproductive malfunctions [Epizootologicheskaya harakteristika, diagnostika i profilaktika smeshannyh infekcij ovec s sindromom porazheniya reproduktivnyh organov]: Authors abstract Doctor of Science dissertation (Veterinary Medicine). M.; 2005. 32 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01003254498#?page=1>. (in Russian)
- Kjelstrup C. K., Barber A. E., Norton J. P., Mulvey M. A., L'Abée-Lund T. M. *Escherichia coli* O78 isolated from septicemic lambs shows high pathogenicity in a zebrafish model. *Vet. Res.* 2017; 48(3). DOI: 10.1186/s13567-016-0407-0.
- Usachev I. I. Intestinal microbiocenosis, its evaluation and control in sheep, targeted formation in newborn lambs [Mikrobiocenoz kishchnika, ego ocenka i kontrol' u ovec, celenapravlennoe formirovanie u novorozhdennyh yagnyat]: Authors abstract Doctor of Science dissertation (Veterinary Medicine). M.; 2014. 368 p. Available at: <http://viev.ru/wordpress/wp-content/uploads/2015/01/Dissertacija-Usachev-I-I.pdf>. (in Russian)
- Lenchenko E. M., Mansurova E. A., Motorygin A. V. Characterization of toxigenic *Enterobacteriaceae* from farm animals with gastrointestinal diseases. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*. 2014; 49 (2): 94–104. DOI: 10.15389/agrobology.2014.2.94eng.
- Shamukova D. F., Yakovleva A. M., Sachivkina N. P. Morphology and differential diagnosis of the fungi *Candida* in dogs and cats. In: *Innovation processes in agribusiness [Innovacionnye processy v APK]: Collection of the VI International Research-to-Practice Conference for lecturers, postgraduates and students*. M.: RUDN University; 2014; 201–203. eLIBRARY ID: 24406937. (in Russian)
- Pirozhkov M. K., Lenev S. V., Viktorova E. V., Strelchenko S. A., Tikhonov L. I., Scliarov O. D. Diagnosis, specific prophylaxis and treatment of bacterial diseases of animals. *Veterinariya*. 2011; 1: 24–28. eLIBRARY ID: 15577882. (in Russian)
- Kuryatova E. V., Gerasimova M. V., Tyukavkina O. N., Gavrilov Y. A., Gavrilova G. A. The etiology of the initiative of gastroenteritis of the youth of agricultural animals in the conditions of the Amur Region. *Far East Agrarian Bulletin*. 2018; 1 (45): 60–66. DOI: 10.24411/1999-6837-2018-11010. (in Russian)
- Sushma, Nehra V., Jakhar K. K. Aetio-pathological studies of digestive and respiratory affections in lambs. *Pharma Innovation*. 2018; 7 (5): 100–105. Available at: <https://www.thepharmajournal.com/archives/2018/vol7issue5/PartB/7-4-112-798.pdf>.
- Lenchenko E. M. Biology and ecology of *Yersinia* – agent of alimentary toxicological infections [Biologiya i ekologiya iersinii – vozбудитеlej pishchevyh toksikoinfekcij]: Authors abstract Doctor of Science dissertation (Veterinary Medicine). M.; 2000. 382 p. (in Russian)
- Klemenov A. V., Martynov V. L., Torgushina N. S. Primary biliary valvule insufficiency as visceral phenotypical marker of connective tissue dysplasia. *Medical News of North Caucasus*. 2008; 2: 83–86. eLIBRARY ID: 15287251. (in Russian)
- Agarkov N. V. Macro- and micromorphology of coecum and its blood vessels in the North Caucasian sheep breed during postnatal ontogenesis [Makro- i mikromorfologiya slepoi kishki i ee krovenosnogo rusla ovec severokavkazskoj porody v postnatal'nom ontogeneze]: Authors abstract Candidate of Science thesis (Biology). Stavropol; 2018. 23 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01008708014#?page=1>. (in Russian)
- Pleshakova V. I., Kolotilova A. N., Lescheva N. A. Pathogenicity factors of microorganisms isolated from drinking water and biofilm technology

elements water system of agricultural enterprises. *Modern Problems of Science and Education*. 2013; 1:476. eLIBRARY ID: 18829425. Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8337>. (in Russian)

16. Sakhno N. V., Timokhin O. V., Sakhno O. N. Improving of the method for the cultivation of microorganisms. *Theoretical and Applied Problems of Agro-Industry [Teoreticheskie i prikladnye problemy agropromyshlennogo kompleksa]*. 2014; 1 (18): 45–47. eLIBRARY ID: 22369389. Available at: http://www.nitu.ru/tppapk/14_1.pdf. (in Russian)

17. Lerma L. L., Benomar N., Knapp C. W., Correa Galeote D., Gálvez A., Abriouel H. Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PLoS One*. 2014; 9 (12): e114252. DOI: 10.1371/journal.pone.0114252.

18. Vuotto C., Longo F., Pascolini C., Donelli G., Balice M. P., Libori M. F., et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol.* 2017; 123 (4): 1003–1018. DOI: 10.1111/jam.13533.

19. Pruntova O. V., Shadrova N. B. Modern methods for determination of microbiological spoilage of food products and raw food materials (analytical review). *Veterinary Science Today*. 2017; 2: 27–33. Available at: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/300>. (in Russian)

20. Ermolenko Z. M., Fursova N. K. Microbiological spoilage of food and promising approaches to combat the phenomenon. *Bacteriology*. 2018; 3 (3): 46–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-46-57. (in Russian)

21. Lenchenko E. M. Morphofunctional properties and population variability of *Yersinia* affecting farm animals, depending on the temperature factor [Morfofunktsional'nye svoystva i populyatsionnaya izmenchivost' iersinii, porazhayushchih sel'skokhozyajstvennykh zhivotnykh, v zavisimosti ot temperaturnogo faktora]. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*. 1996; 6: 88–95. (in Russian)

22. Milko E. S., Krasilnikova E. N., Milko D. M. The value of heterogeneity of bacteria population, created by the process of dissociation, for the growth of purple photosynthetic bacteria in their natural habitat. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2016; 3: 55–59. Available at: <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/344/0>. (in Russian)

23. Lenchenko E., Lozovoy D., Strizhakov A., Vatnikov Y., Byakhova V., Kulikov E., et al. Features of formation of *Yersinia enterocolitica* biofilms. *Vet. World*. 2019; 12 (1): 136–140. DOI: 10.14202/vetworld.2019.136-140.

24. Laffey S. F., Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology (Reading)*. 2005; 151 (Pt 4): 1073–1081. DOI: 10.1099/mic.0.27739-0.

25. Aertsen A., Michiels C. W. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit. Rev. Microbiol.* 2004; 30 (4): 263–273. DOI: 10.1080/10408410490884757.

26. Pakhomov Yu. D. Production, detection and description of non-cultivated bacterial cells [Poluchenie, detektsiya i harakteristika nekul'tiviruemykh kletok bakterij]: Authors abstract Candidate of Science thesis (Biology). M.; 2013. 23 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01005537423#?page=1>. (in Russian)

27. Blinkova L. P., Pakhomov Yu. D., Dmitrieva O. V., Altshuler M. L. Non-culturable bacteria in lyophilized non spore-forming probiotics. In: *Proceedings of the 13th International Conference "Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds: Science and Practical Application"*. Kyoto, Japan, May 11–12, 2013. Ed. by H. Nishino, T. Yoshikawa, D. Martirosyan. Dallas: Food Science Publisher; 2013; 79–80. Available at: <https://www.functional-foodscenter.net/files/82940156.pdf>.

28. Nagata T., Mukae H., Kadota J., Hayashi T., Fujii T., Kuroki M., et al. Effect of erythromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (6): 2251–2259. DOI: 10.1128/AAC.48.6.2251-2259.2004.

29. Lenchenko E., Blumenkrants D., Sachivkina N., Shadrova N., Ibragimova A. Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Vet. World*. 2020; 13 (1): 197–200. DOI: 10.14202/vet-world.2020.197-200.

30. Lenchenko E. M., Sachivkina N. P. Studies of biofilms and phenotypic characteristics of *Candida* fungi. *Veterinary Science Today*. 2020; 2: 132–138. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-132-138.

31. Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Yevstigneyeva S. S., Shelud'ko A. V., Ponomareva E. G., Petrova L. P., Katsy E. I. On the contribution of cell aggregation and extracellular DNA to biofilm formation and stabilization in *Azospirillum brasilense* bacteria. *Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2018; 18 (4): 399–406. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406. (in Russian).

32. Sachivkina N., Lenchenko E., Strizhakov A., Zimina V., Gnesdilova L., Gavrilov V., et al. The evaluation of intensity of formation of biomembrane by microscopic fungi of the *Candida* genus. *Int. J. Pharmaceutical Res.* 2018; 10 (4): 738–744. DOI: 10.31838/ijpr/2018.10.04.128.

33. Bergey D. H., Holt J. G., Pfennig N., Bryant M. P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989; 4. 2648 p.

34. Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. Identifier of pathogenic and opportunistic fungi [Opredelitel' patogennykh i uslovno patogennykh gribov]: trans. from English K. L. Tarasova, Yu. N. Kovaleva; ed. by I. R. Dorozhkova. M.: Mir; 2001. 468 p. (in Russian)

35. Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T., Ghannoum M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 2001; 183 (18): 5385–5394. DOI: 10.1128/jb.183.18.5385-5394.2001.

36. Cadavid E., Echeverri F. The search for natural inhibitors of biofilm formation and the activity of the autoinductor C6-AHL in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884. *Biomolecules*. 2019; 9 (2):49. DOI: 10.3390/biom9020049.

37. Kirchhoff C., Cypionka H. Propidium ion enters viable cells with high membrane potential during live-dead staining. *J. Microbiol. Methods*. 2017; 142: 79–82. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.09.011.

Поступила 29.12.2020

Принята в печать 17.02.2021

Received on 29.12.2020

Approved for publication on 17.02.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ленченко Екатерина Михайловна, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «МГУПП», г. Москва, Россия.

Сачивкина Надежда Павловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии медицинского института Российского университета дружбы народов, г. Москва, Россия.

Блюменкранц Дмитрий Алексеевич, аспирант кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «МГУПП», г. Москва, Россия.

Арсенюк Анна Юрьевна, кандидат биологических наук, старший сотрудник отдела санитарной и клинической микробиологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Ekaterina M. Lenchenko, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Department of Veterinary Medicine, Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia.

Nadezda P. Sachivkina, Candidate of Science (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia.

Dmitry A. Blumenkrants, Post-Graduate Student, Department of Veterinary Medicine, Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia.

Anna Yu. Arsenyuk, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Department of Sanitary and Clinical Microbiology, FGBI "VGNKI", Moscow, Russia.