

Д.Г. Тюрина ✉
 Е.П. Горфункель
 В.А. Филиппова
 Г.Ю. Лаптев
 Н.И. Новикова
 Е.А. Йылдырым
 Л.А. Ильина
 А.В. Дубровин
 А.С. Дубровина
 К.А. Калиткина
 В.А. Заикин
 Е.С. Пономарева
 А.А. Савичева
 Н.С. Патюкова

ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург,
 Россия

✉ tiurina@biotrof.ru

Поступила в редакцию:
 16.11.2023

Одобрена после рецензирования:
 12.02.2024

Принята к публикации:
 28.02.2024

Research article

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-380-3-85-91

Daria G. Tyurina ✉
 Elena P. Gorfunkel
 Valentina V. Filippova
 Georgy Yu. Laptev
 Natalia I. Novikova
 Elena A. Yildirim
 Larisa A. Ilyina
 Andrey V. Dubrovin
 Alisa S. Dubrovina
 Xenia A. Kalitkina
 Vasily V. Zaikin
 Ekaterina S. Ponomareva
 Alesya A. Savicheva
 Natalia S. Patyukova

Biotroph Ltd, Saint-Petersburg, Russia

✉ tiurina@biotrof.ru

Received by the editorial office:
 16.11.2023

Accepted in revised:
 12.02.2024

Accepted for publication:
 28.02.2024

Развитие антибиотикорезистентности микроорганизмов у цыплят-бройлеров под влиянием ветеринарных антибиотиков и пробиотика

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Широкое применение антимикробных препаратов в сельском хозяйстве и заинтересованность потребителей в получении продукции, свободной от антибиотиков, побуждают к разработке альтернативных средств. Цели исследования — изучение антибиотикорезистентности микроорганизмов, развившейся вследствие приема ветеринарных антибиотиков цыплятами-бройлерами, влияние скармливания метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» на динамику антибиотикорезистентности.

Методы. Были сформированы три группы цыплят-бройлеров: I — контрольная, получавшая основной рацион, II — опытная, получавшая дополнительно к рациону I группы ветеринарные антибиотики энрофлоксацин и колистин, III — опытная, получавшая дополнительно к рациону II группы метапробиотик «Пробиоцид-Ультра». Оценку экспрессии генов антибиотикоустойчивости проводили с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. С помощью высевов на среды была оценена антибиотикоустойчивость классическими методами микробиологии.

Результаты. Была изучена динамика накопления количества детерминант антибиотикоустойчивости микроорганизмов в результате выпойки цыплятам-бройлерам ветеринарных антибиотиков энрофлоксацина и колистина. Под действием энрофлоксацина происходило увеличение антибиотикорезистентности к самому энрофлоксацину, а также к бета-лактамам антибиотикам, тетрациклину и колистину. Под действием колистина увеличивалось количество генов устойчивости к самому колистину, а также энрофлоксацину и бета-лактамам антибиотикам. Добавление в корм птице метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» способствовало заметному снижению количества генов антибиотикоустойчивости, а при высевах на среды приводило к исчезновению антибиотикоустойчивых к колистину энтеробактерий.

Ключевые слова: птицеводство, антибиотики, антибиотикорезистентность, гены антибиотикорезистентности, пробиотик

Для цитирования: Тюрина Д.Г. и др. Развитие антибиотикорезистентности микроорганизмов у цыплят-бройлеров под влиянием ветеринарных антибиотиков и пробиотика. *Аграрная наука*. 2024; 380(3): 85–91.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-380-3-85-91>

© Тюрина Д.Г., Горфункель Е.П., Филиппова В.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Дубровин А.В., Дубровина А.С., Калиткина К.А., Заикин В.В., Пономарева Е.С., Савичева А.А., Патюкова Н.С.

The development of antimicrobial resistance in broilers affected by veterinary antimicrobials and a probiotic administration

ABSTRACT

Relevance. The broad use of antimicrobials by agriculture and consumers' motivation to buy antibiotic-free production form a basis to development of substitutes to antimicrobials. The goal of research was the analysis of antimicrobial resistance caused by veterinary antimicrobials administration to broilers, as well as the effect of metaprobiotic "Probiocid-Ultra" on antimicrobial resistance in dynamic.

Methods. Three groups of broiler chickens were formed: I — control, who received the main diet, II — experimental, who received veterinary antibiotics enrofloxacin and colistin in addition to the diet of group I, III — experimental, who received the metaprobiotic "Probiocid-Ultra" in addition to the diet of group II. Gene expression analysis was performed using quantitative reverse transcription PCR. With inoculation to different media the antimicrobial resistance was examined with classical microbiological methods.

Results. The dynamic of accumulation of antimicrobial resistance determinants caused by enrofloxacin and colistin administration to broilers was examined. Under the influence of enrofloxacin the increase in antimicrobial resistance to enrofloxacin itself, as well as to beta-lactams, tetracycline and colistin was observed. Under the influence of colistin the increase in antimicrobial resistance to colistin itself, as well as to enrofloxacin and beta-lactams was observed. The feed administration with metaprobiotic "Probiocid-Ultra" promoted noticeable decrease of the antimicrobial resistance genes amount, when analyzed with growth medium led to antimicrobial resistant enterobacteria vanished.

Key words: poultry, antibiotics, antimicrobial resistance, antimicrobial resistance genes, probiotic

For citation: Tyurina D.G. *et al.* The development of antimicrobial resistance in broilers affected by veterinary antimicrobials and a probiotic administration. *Agrarian science*. 2024; 380(3): 85–91 (in Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-380-3-85-91>

© Tyurina D.G., Gorfunkel E.P., Filippova V.A., Laptev G.Yu., Novikova N.I., Yildirim E.A., Ilyina L.A., Dubrovin A.V., Dubrovina A.S., Kalitkina K.A., Zaikin V.V., Ponomareva E.S., Savicheva A.A., Patyukova N.S.

Введение/Introduction

Современная интенсивная технология выращивания птицы предполагает широкое применение антимикробных препаратов. В последние годы можно наблюдать общемировую тенденцию по ограничению применения антибактериальных средств в птицеводстве. В частности, в России установлен запрет на использование противомикробных препаратов для ветеринарного применения не в лечебных целях с 2020 года¹.

Потребители демонстрируют интерес к продукции птицеводства, полученной без использования антимикробных веществ вообще или без использования их медицински значимых аналогов [1].

Тем не менее специалисты продолжают применять разнообразные антимикробные препараты. Принято выделять так называемые ветеринарные и кормовые антибиотики. Кормовой антибиотик (или так называемый стимулятор роста) может быть определен как лекарственное средство, которое обладает бактериостатическим либо бактерицидным действием, а также применяется в низких субтерапевтических дозах².

Ветеринарные антибиотики в птицеводстве могут назначаться с целью лечения, контроля за распространением заболевания, профилактики, метафилактики заболеваний [2]. На практике бывает сложно отделить намерения применения антимикробных препаратов, поскольку зоотехнические и ветеринарные подходы могут преследовать общие цели.

В продукции птицеводства, представленной на рынке России, обнаруживаются остаточные количества антимикробных веществ [3, 4]. Угрозу здоровью и благополучию человека представляют как сами остаточные количества антимикробных препаратов, так и распространяющаяся в результате их применения антибиотикорезистентность микроорганизмов. Каналами передачи генов устойчивости к антимикробным препаратам выступают сотрудники птицеводческих предприятий и сама продукция птицеводства.

Кроме того, внесение на поля органических удобрений, полученных из подстилки и помета птиц, способствует попаданию как самих антимикробных препаратов, так и устойчивых микроорганизмов в водоемы и почву [5]. Особенно высокий уровень загрязнения показывают овощи и зелень [6, 7]. Однако, несмотря на важность проблемы антибиотиков и лекарственной устойчивости, наблюдается недостаточное изучение вопросов возникновения устойчивых к антимикробным препаратам микроорганизмов в птицеводстве. Кроме того, слабо освещены вопросы применения заменителей кормовых антибиотиков вместе с ветеринарными антибиотиками.

Цель исследования — изучение антибиотикорезистентности микроорганизмов, развившейся вследствие приема ветеринарных антибиотиков, с помощью молекулярно-генетических и классических методов микробиологии. Раскрытие возможностей изменения количества устойчивых микроорганизмов под влиянием скармливания цыплятам-бройлерам метапробиотика на основе спорообразующих микроорганизмов.

Материалы и методы исследования / Materials and methods

Эксперимент проводили на цыплятах-бройлерах кросса Ross 308, продолжительность выращивания — с точного возраста до 35 дней в виварии ООО «БИОТРОФ» (г. Санкт-Петербург, Россия) в 2022 году.

Условия кормления, поения, содержания соответствовали требованиям кросса¹.

Были сформированы три группы цыплят (по 35 голов в каждой группе):

I — контрольная, получавшая полнораціонный комбикорм для бройлеров ПК-5 до 28 дней, ПК-6 — до окончания выращивания;

II — опытная, получавшая дополнительно к рациону I группы ветеринарные антибиотики энрофлоксацин («Энроксил», 10%-ный раствор для перорального применения, KRKA, Словения) 1–5-е сутки выращивания и колистин («Колистин» 2 млн, АВЗ-СП, Россия) 27–31-е сутки выращивания в соответствии с инструкцией производителя;

III — опытная группа, получавшая дополнительно к рациону II группы метапробиотик «Пробиоцид-Ультра» на основе пробиотических штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* и смеси органических кислот и солей органических кислот («БИОТРОФ», Россия). В состав рецепта комбикорма не были включены кормовые антибиотики.

Для определения экспрессии генов антибиотикорезистентности кишечной микрофлоры птицы на 1-е, 3-и, 5-е, 29-е, 31-е сутки прижизненно отбирались пробы фекалий от трех птиц из каждой группы в пластиковые микропробирки типа «эппендорф». Образцы стабилизировали с помощью реагента RNeasy (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и незамедлительно отправляли в молекулярно-генетическую лабораторию ООО «БИОТРОФ» для выделения РНК. Далее формировалась среднесмешанная проба от каждой группы.

Пробы микрофлоры в первый день отбирались через 12 часов от начала выпойки антибиотика.

Таргетный анализ генов антибиотикорезистентности был выполнен методом количественной ПЦР с использованием амплификатора ДТлайт («ДНК-Технология», Россия) из расчета по отношению к копии гена 16S-rРНК. Реакцию амплификации с праймерами генов интереса проводили при помощи набора SsoAdvanced Universal SYBR Green Supremix (BioRad, США) согласно протоколу производителя.

Относительную экспрессию оценивали методом 2- $\Delta\Delta$ CT [8]. В качестве референсного гена был выбран Eub для фрагмента гена 16S rРНК. Следует отметить, что данный анализ предполагает оценку изменения резистенции всего микробиома; результаты представляются в относительных величинах по отношению к уровню контрольной группы.

Детерминанты антибиотикорезистентности (табл. 1) были выбраны, с тем чтобы попытаться оценить устойчивость микробиома как к употребленным птицами энрофлоксацину и колистину, так и к другим антимикробным препаратам.

Выбранные праймеры позволяют оценить распространение генов антибиотикорезистентности к фторхинолонам

¹ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 30.03.2019 № 604-р.

² Hughes P., Heritage J. Antibiotic growth-promoters in food animals. In assessing quality and safety of animal feeds. FAO, Rome, Italy. 2004. Доступно по адресу: <https://www.fao.org/3/y5159e/y5159e08.htm>

³ Справочник по выращиванию бройлеров ROSS. 2018.

Таблица 1. Перечень праймеров для оценки уровня развития антибиотикорезистентности

Table 1. Primers selected for antimicrobial resistance evaluation

Ген	Последовательность	Ген	Последовательность
<i>gyrA</i>	CCGTCGCAATTCCTACG AGTTGCTCCATTAACCA	<i>mcr-1</i>	GCTGAACATACACGGCACAG CGACCAAGCCGAGCTAAGG
<i>gyrB</i>	TTCTCCGATTCCTCATG AGAAGGGTACGAATGTGG	<i>tetA</i>	GCTRTATGCGTTGTGCAAT TCCTCGCCGAAAATGACC
<i>parC</i>	TGGGTGAAGCCGGTTC TGCTGCCAAGACCGTTGG	<i>blaSHV</i>	TGTTAGCCACCCTGCCGCT GTTGCCAGTGCATCAG
<i>parE</i>	AAGGCGCGTGTGAGAGC TCTGCTCCAACACCCGCA	<i>ampC</i>	GTGACCAGATACTGGCCACA TACTGTAGCGCCTCGAGGA

(*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) [9], колистину (*mcr-1*) [10], тетрациклину (*tetA*) и бета-лактамам антибиотикам (*blaSHV*, *ampC*) [11].

Отобранные праймеры предполагают поиск различных механизмов лекарственной устойчивости: изменение мишени антибиотика (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *mcr-1*), инактивацию антибиотика (*blaSHV*, *ampC*), эффлюкс-насос (*tetA*).

Параллельно была оценена антибиотикоустойчивость микроорганизмов методом серийных разведений⁴. Прижизненно были отобраны пробы фекалий от трех птиц каждой группы на 5-е и 31-е сутки и произведены посевы на среды Эндо (НПО «Микроген», Россия), MRS-агар (Condalab, Испания), энтерококк-агар (Condalab, Испания) как без добавления антибиотика, так и с добавлением антибиотика в лечебной дозировке, рекомендованной производителем, а также в двукратной дозировке. Статистическую обработку данных производили с помощью программы MS Excel 97-2003 (США). Результаты представлены как средняя арифметическая (M) и стандартные ошибки средних (\pm SEM). Достоверность различий устанавливали по t-критерию Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p \geq 0.95$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

В эксперименте по изучению влияния рациона на развитие антибиотикоустойчивости микроорганизмов у цыплят-бройлеров показано развитие лекарственной устойчивости микробиома в ответ на выпойку ветеринарных антибиотиков.

Динамика генов антибиотикорезистентности представлена в таблицах 2а, 2б, 4а, 4б.

Можно отметить волнообразный характер динамики детерминант антибиотикорезистентности: всплеск на 1-е сутки приема (по генам *tetA*, *blaSHV*, *ampC*), затем снижение уровня антибиотикоустойчивости. Далее (на 29-е, 31-е сутки) умеренное превышение количества генов антибиотикоустойчивости по сравнению с уровнем контрольной группы.

В первые пять суток жизни цыплята II–III опытных групп получали энрофлоксацин, поэтому рост количества детерминант устойчивости к хинолоновым препаратам (гены *parC* и *parE*) представляется естественным [12].

Вызывает интерес резкий рост количества детерминант антибиотикоустойчивости *tetA* (устойчивость к тетрациклину), достигнутого более чем 1000-кратного превышения относительно уровня контроля. Схожие результаты были продемонстрированы ранее в эксперименте на бычках. В результате приема энрофлоксацина наблюдалось повышение уровня гена *tetA* в фекалиях бычков опытной группы по сравнению с уровнем контрольной группы в десятки раз [13].

Резкий рост количества детерминант устойчивости *ampC*, управляющих бета-лактамазами и кодирующих устойчивость к цефалоспорином I и II поколения, был отмечен на 1-е и 5-е сутки приема энрофлоксацина. В те же даты возрастало количество генов *blaSHV*, ответственных за синтез бета-лактамаз расширенного спектра.

Известно, что выделенные из внутренних органов сельскохозяйственной птицы кишечные палочки обладали множественной лекарственной устойчивостью практически ко всем антимикробным препаратам, разрешенным для применения в ветеринарии [14]. Результаты бразильских исследователей демонстрируют широчайшее разнообразие молекулярных механизмов лекарственной устойчивости изолятов, выделенных из мяса птицы [15]. Тем не менее слабо раскрыт характер возникновения лекарственной устойчивости под действием конкретного антибиотика у птицы.

Авторы наблюдали развитие кросс-резистентности к бета-лактамам антибиотикам в результате приема энрофлоксацина. В последние годы от птиц часто выделяют кишечные палочки, продуцирующие бета-лактамазы [16]. Возможно, это связано с тем, что в результате широкого применения хинолоновых препаратов (прежде всего энрофлоксацина и ципрофлоксацина) происходит развитие устойчивости к бета-лактамам

Таблица 2а. Детерминанты антибиотикорезистентности в динамике на фоне приема энрофлоксацина (для генов *parC*, *parE*, *gyrA*, *gyrB*)

Table 2a. Antimicrobial resistance genes in dynamics during enrofloxacin treatment (for genes *parC*, *parE*, *gyrA*, *gyrB*)

Дата отбора образцов	Детерминанты антибиотикорезистентности							
	<i>parC</i>		<i>parE</i>		<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>	
	II группа	III группа	II группа	III группа	II группа	III группа	II группа	III группа
1-е сутки	0	104,0	29,0	48,5	0	0	0	0
3-е сутки	11,3	24,3	6,1	19,7	0	0	0	0
5-е сутки	7,5	6,1	7,5	5,3	0	0	0,6	2,3

Таблица 2б. Детерминанты антибиотикорезистентности в динамике на фоне приема энрофлоксацина (для генов *mcr1*, *tetA*, *blaSHV*, *ampC*)

Table 2b. Antimicrobial resistance genes in dynamics during enrofloxacin treatment (for genes *mcr1*, *tetA*, *blaSHV*, *ampC*)

Дата отбора образцов	Детерминанты антибиотикорезистентности							
	<i>mcr-1</i>		<i>tetA</i>		<i>blaSHV</i>		<i>ampC</i>	
	II группа	III группа	II группа	III группа	II группа	III группа	II группа	III группа
1-е сутки	42,2	32	2048	337,7	128	208	157,6	8,6
3-е сутки	2,5	13	5,3	1,4	1,7	9,9	12,1	7
31-е сутки	0,71	0,81	0	0	0,7	0,9	0,3	0,6

⁴ Методические указания МУК 4.2.1890-04 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания (утв. Минздравом России 04.03.2004).

Таблица 3. Антибиотикорезистентность микроорганизмов по отношению к энрофлоксацину на 5-е сутки эксперимента (отличия с контролем достоверны при: (α) p > 0,95, (β) p > 0,99)

Table 3. Antimicrobial resistance to enrofloxacin on 5th day of trial (differences are statistically significant when: (α) p > 0.95, (β) p > 0.99)

Количество клеток, КОЕ/мл	I – контрольная	II – опытная	III – опытная
На среде Эндо	1,8*10 ⁷ ± 1,4*10 ⁶	4,7*10 ⁷ ± 5,7*10 ⁶ (β)	4,3*10 ⁷ ± 1,8*10 ⁶ (β)
На среде Эндо с добавлением антибиотика в дозировке производителя	0	2,8*10 ⁵ ± 1,4*10 ⁵	3,2*10 ⁵ ± 7,4*10 ⁴
На среде Эндо с двукратной дозировкой антибиотика	0	2,0*10 ⁴ ± 7,0*10 ³	4,0*10 ⁴ ± 7,0*10 ³
На среде MRS	1,0*10 ⁹ ± 1,1*10 ⁸	5,7*10 ⁸ ± 1,2*10 ⁸ (α)	4,0*10 ⁸ ± 4,2*10 ⁷ (β)
На среде MRS с добавлением антибиотика в дозировке производителя	1,2*10 ⁹ ± 1,1*10 ⁸	7,2*10 ⁸ ± 2,8*10 ⁷ (β)	7,0*10 ⁸ ± 1,8*10 ⁷ (β)
На среде MRS с двукратной дозировкой антибиотика	7,2*10 ⁸ ± 2,1*10 ⁷	8,8*10 ⁸ ± 5,3*10 ⁷	6,4*10 ⁸ ± 4,6*10 ⁷
На среде энтерококк-агар	6,3*10 ⁵ ± 1,4*10 ⁴	8,0*10 ⁷ ± 7,1*10 ⁶ (β)	8,5*10 ⁷ ± 3,5*10 ⁶ (β)
На среде энтерококк-агар с добавлением антибиотика в дозировке производителя	0	0	0
На среде энтерококк-агар с двукратной дозировкой антибиотика	0	0	0

антибиотикам, что приводит к снижению их эффективности.

На взгляд авторов, важным наблюдением является то, что прием энрофлоксацина в 1–5-е сутки приводил к росту антибиотикорезистентности к колистину (по гену *mcr-1*). Ранее сообщалось, что практически все изоляты грамотрицательных микроорганизмов, выделенных от птицы, обладали перекрестной устойчивостью к колистину и фторхинолоновым препаратам, кодируемой, соответственно, генами *mcr-1* и *gyrA*, *parC* [17]. Этот факт может иметь значение для практики птицеводства, так как энрофлоксацин и колистин входят в число часто применяемых антибактериальных препаратов в птицеводстве. Так, в России зарегистрированы 14 ветеринарных препаратов в виде смеси энрофлоксацина и колистина⁵.

Таким образом, желаемый эффект от совместного применения этих антибиотиков может быть не достигнут из-за развития перекрестной антибиотикоустойчивости.

Таблица 4а. Детерминанты антибиотикорезистентности в динамике на фоне приема колистина (для генов *parC*, *parE*, *gyrA*, *gyrB*)

Table 4a. Antimicrobial resistance genes in dynamics during colistin treatment (for genes *parC*, *parE*, *gyrA*, *gyrB*)

Дата отбора образцов	Детерминанты антибиотикорезистентности							
	<i>parC</i>		<i>parE</i>		<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>	
	II группа	III группа	II группа	III группа	II группа	III группа	II группа	III группа
29-е сутки	3	2,3	0,7	2,6	0	0	0	0
31-е сутки	0,7	1	0,9	1,7	1	1,5	0	0

Таблица 4б. Детерминанты антибиотикорезистентности в динамике на фоне приема колистина (для генов *mcr1*, *tetA*, *blaSHV*, *ampC*)

Table 4b. Antimicrobial resistance genes in dynamics during colistin treatment (for genes *mcr1*, *tetA*, *blaSHV*, *ampC*)

Дата отбора образцов	Детерминанты антибиотикорезистентности							
	<i>mcr-1</i>		<i>tetA</i>		<i>blaSHV</i>		<i>ampC</i>	
	II группа	III группа	II группа	III группа	II группа	III группа	II группа	III группа
29-е сутки	2,3	1,2	0	0	3,7	1,4	2,6	2
31-е сутки	0,71	0,81	0	0	0,7	0,9	0,3	0,6

Таблица 5. Антибиотикорезистентность микроорганизмов по отношению к колистину на 31-е сутки эксперимента (отличия с контролем достоверны при: (α) p > 0,95, (β) p > 0,99)

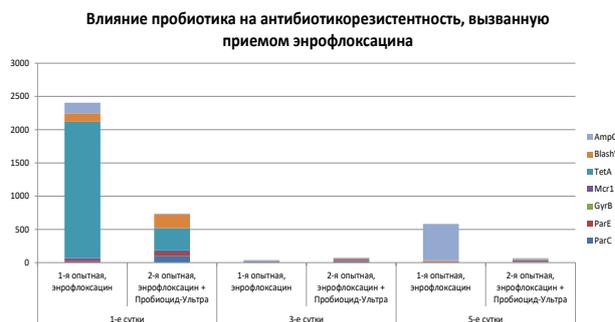
Table 5. Antimicrobial resistance to colistin on 31st day of trial (differences are statistically significant when: (α) p > 0.95, (β) p > 0.99)

Количество клеток, КОЕ/мл	I – контрольная	II – опытная	III – опытная
На среде Эндо	2,1*10 ⁵ ± 2,8*10 ⁴	9,8*10 ⁶ ± 5,3*10 ⁵ (β)	2,9*10 ⁷ ± 2,8*10 ⁶ (β)
На среде Эндо с добавлением антибиотика в дозировке производителя	0	5,5*10 ⁵ ± 3,5*10 ⁴	0
На среде Эндо с двукратной дозировкой антибиотика	0	1,2*10 ⁵ ± 2,1*10 ⁴	0
На среде MRS	2,9*10 ⁸ ± 4,6*10 ⁷	1,5*10 ⁸ ± 2,8*10 ⁷	2,0*10 ⁸ ± 2,1*10 ⁷
На среде MRS с добавлением антибиотика в дозировке производителя	1,5*10 ⁷ ± 7,1*10 ⁵	2,1*10 ⁸ ± 2,8*10 ⁷ (α)	8,7*10 ⁷ ± 1,8*10 ⁶ (β)
На среде MRS с двукратной дозировкой антибиотика	1,7*10 ⁷ ± 1,4*10 ⁶	1,1*10 ⁸ ± 1,4*10 ⁷ (α)	6,5*10 ⁷ ± 2,1*10 ⁶ (β)
На среде энтерококк-агар	3,8*10 ⁵ ± 5,3*10 ⁴	1,2*10 ⁶ ± 2,1*10 ⁵	8,5*10 ⁶ ± 2,1*10 ⁵ (β)
На среде энтерококк-агар с добавлением антибиотика в дозировке производителя	2,3*10 ⁵ ± 1,8*10 ⁴	7,2*10 ⁵ ± 5,7*10 ⁴ (α)	1,5*10 ⁶ ± 3,5*10 ⁵
На среде энтерококк-агар с двукратной дозировкой антибиотика	1,4*10 ⁵ ± 1,4*10 ⁴	4,7*10 ⁵ ± 2,1*10 ⁴ (β)	6,1*10 ⁵ ± 2,8*10 ⁴ (β)

⁵ https://galen.vetr.ru/#/registry/pharm/registry?page=1&f_chemicalName=энрофлоксацин,%20колистин (дата обращения: 16/10/2023).

Рис. 1. Влияние метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» на количество генов антибиотикорезистентности на фоне приема энрофлоксацина

Fig. 1. Metaprobiotic “Probiocid-Ultra” administration influence on the amount of antimicrobial resistance genes during enrofloxacin treatment



Результаты микробиологических посевов на селективных средах на 5-е сутки эксперимента представлены в таблице 3.

Выпойка энрофлоксацина привела к развитию антибиотикоустойчивых энтеробактерий в содержимом кишечника птиц. По всей видимости, выпойка энрофлоксацина оказывала незначительное влияние на содержание молочнокислых бактерий: при культивировании на MRS-агаре микроорганизмов из проб от II и III групп наблюдалось снижение их количества на полпорядка.

Прием метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» соответствовал сокращению количества генов антибиотикорезистентности. Можно видеть, что на фоне приема энрофлоксацина (рис. 1) прием метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» способствовал резкому сокращению антибиотикоустойчивости микробиома птиц, причем наибольшее сокращение достигнуто по генам *ampC* и *tetA*.

В план эксперимента была включена двукратная антибиотикотерапия. Результаты оценки антибиотикоустойчивости микроорганизмов представлены в таблицах 4а, 4б, 5.

Отметим, что под влиянием приема колистина наблюдался рост устойчивости к энрофлоксацину (по генам *parC*, *parE*), к самому колистину (*mcr-1*), а также к бета-лактамам антибиотикам (*blaSHV*, *ampC*). Добавление метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» оказывало разнонаправленное влияние на развитие антибиотикорезистентности (рис. 2).

Результаты посевов на среды представлены в таблице 5. Прием колистина способствовал развитию устойчивых к колистину энтеробактерий во II группе, при этом под влиянием приема метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» наблюдалось отсутствие антибиотикорезистентных мутантов.

С практической точки зрения это может свидетельствовать о восстановлении чувствительности энтеробактерий к антибиотику при приеме пробиотика. Возможно, восстановление чувствительности микроорганизмов к антибиотику может быть одним из факторов, раскрывающим положительное действие пробиотических препаратов на зоотехнические и ветеринарные показатели выращивания птиц.

Сравнение результатов оценки развития антибиотикорезистентности на фоне приема пробиотика, выполненных с помощью классических методов микробиологии и молекулярно-генетическими методами, показывает ограниченность использованных средств.

С одной стороны, в распоряжении был ограниченный набор праймеров, которые не могли охватить все молекулярные механизмы устойчивости к антибиотикам, с другой — ограниченный набор микробиологических сред и антибиотиков не способствовал всесторонней оценке резистента. Тем не менее удалось показать как развитие антибиотикорезистентности микробиома под влиянием приема энрофлоксацина (табл. 2а, 2б, 3) и колистина (табл. 4а, 4б, 5), так и ее снижение под действием метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» (рис. 1, табл. 5).

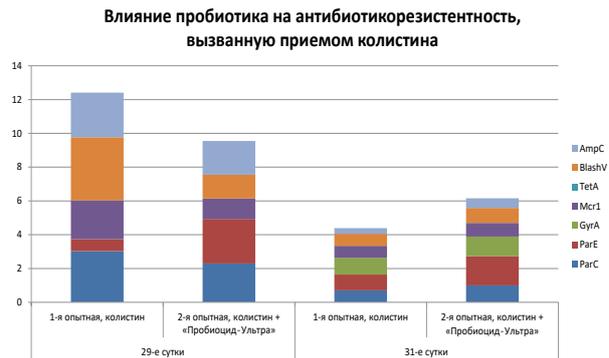
На взгляд авторов, восстановление чувствительности микробиома к антибиотикам в результате интродукции пробиотических штаммов микроорганизмов может иметь важное значение для практики птицеводства, поскольку фактически восстанавливает активность антибиотиков.

Существуют свидетельства о влиянии пробиотиков на снижение количества антибиотикостойчивых форм патогенных микроорганизмов. Так, выпойка пробиотика цыплятам-бройлерам способствовала сокращению количества кишечных палочек, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра, сокращению факторов вирулентности [18]. Было показано, что интродукция *in ovo* пробиотического штамма *Lactobacillus rhamnosus* способствует сокращению устойчивости патогенных микроорганизмов к аминокликозидам и триметоприму [19].

Одним из механизмов антибиотикорезистентности может быть активизация реконструкции ДНК клеток-мишеней, мутагенеза и горизонтальной передачи генов под действием антимикробного агента,

Рис. 2. Влияние метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» на количество генов антибиотикорезистентности на фоне приема колистина

Fig. 2. Metaprobiotic “Probiocid-Ultra” administration influence on the amount of antimicrobial resistance genes during colistin treatment



входящая в комплекс SOS-ответа. Было показано, что метаболиты пробиотических штаммов бацилл снижают SOS-ответ микроорганизмов под действием антибиотиков [20, с. 88–96]. В частности, некоторые ингибиторы SOS-ответа снижают способности бактерий к приобретению устойчивости к антибиотикам и уменьшают частоту переноса плазмид, усиливают бактерицидное действие антибиотика [21].

Пробиотики достаточно давно известны как средство контроля за распространением антибиотикостойчивых микроорганизмов [22, 23]. Однако механизмы этого процесса пока не вполне ясны. Вероятно, общее сокращение количества генов антибиотикостойчивости может быть связано с возрастанием биоразнообразия под влиянием пробиотика, а также с сокращением количества микроорганизмов — носителей генов резистентности.

Кроме того, некоторые метаболиты пробиотических микроорганизмов показывают способность к повышению чувствительности патогенных бактерий к антимикробным препаратам путем ингибирования SOS-ответа.

Выводы/Conclusions

Была продемонстрирована динамика количества генов антибиотикостойчивости микроорганизмов в результате выпойки цыплятам-бройлерам ветеринарных антибиотиков энрофлоксацина и колистина. Под действием энрофлоксацина происходило накопление детерминант антибиотикорезистентности к самому энрофлоксацину, а также к бета-лактамам антибиотикам, тетрациклину и колистину. Под действием колистина увеличивалось количество генов устойчивости к энрофлоксацину, колистину и бета-лактамам антибиотикам. Добавление в корм птице метапробиотика «Пробиоцид-Ультра» способствовало заметному снижению количества генов антибиотикостойчивости, а при высеве на среды приводило к исчезновению антибиотикостойчивых к колистину энтеробактерий.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные.
Все авторы внесли равный вклад в работу.
Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат.
Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.
The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.
The authors declare no conflict of interest.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Smith J.A. Broiler production without antibiotics: United States field perspectives. *Animal Feed Science and Technology*. 2019; 250: 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2018.04.027>
- Phillips I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 53(1): 28–52. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg483>
- Нитяга И.М., Телегина С.А., Галушко Д.П. Мониторинг антибиотиков тетрациклиновой группы в мясе и мясородуктах из птицы с целью предотвращения их загрязнения. *Научные известия*. 2022; 26: 284–288. <https://www.elibrary.ru/vkaiyh>
- Мережко О.Е., Станисhevskaya Н.Б. Формирование устойчивости микроорганизмов при внесении антибиотиков в корма. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2015; (2): 174–176. <https://www.elibrary.ru/tschhb>
- Argudin M.A. et al. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics*. 2017; 6(2): 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6020012>
- Al-Kharousi Z.S., Guizani N., Al-Sadi A.M., Al-Bulushi I.M. Antibiotic Resistance of *Enterobacteriaceae* Isolated from Fresh Fruits and Vegetables and Characterization of their AmpC β -Lactamases. *Journal of Food Protection*. 2019; 82(11): 1857–1863. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-089>
- Dolliver H., Kumar K., Gupta S. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. *Journal of Environmental Quality*. 2007; 36(4): 1224–1230. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0266>
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Федорчук В.В., Грудинина С.А., Кротова Л.А., Черкашин Е.А., Сидоренко С.В., Тишков В.И. Роль мутаций в ДНК-гиразе и топоизомеразе IV в устойчивости *Streptococcus pneumoniae* к фторхинолонам. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2002; 43(6): 349–352. <https://www.elibrary.ru/evgzvf>
- Liu Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016; 16(2): 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Rubab M., Oh D.-H. Molecular Detection of Antibiotic Resistance Genes in Shiga Toxin-Producing *E. coli* Isolated from Different Sources. *Antibiotics*. 2021; 10(4): 344. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040344>
- Ma B., Wang D., Mei X., Lei C., Li C., Wang H. Effect of Enrofloxacin on the Microbiome, Metabolome, and Abundance of Antibiotic Resistance Genes in the Chicken Cecum. *Microbiology Spectrum*. 2023; 11(2): e04795-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04795-22>
- Pereira R.V. et al. Genotypic antimicrobial resistance characterization of *E. coli* from dairy calves at high risk of respiratory disease administered enrofloxacin or tulathromycin. *Scientific Reports*. 2020; 10: 19327. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76232-w>
- Niero G., Bortolaia V., Vanni M., Intorre L., Guardabassi L., Piccirillo A. High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. *Veterinary Microbiology*. 2018; 216: 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.012>
- Crecencio R.B. et al. Antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genetic profiles of *Escherichia coli* isolated from retail chicken meat. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020; 84: 104355. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104355>
- Макавич С.А., Пушкина В.С., Кротова А.Л. Детекция *Escherichia coli* с продукцией бета-лактамаз и проблемы антибиотикотерапии в производстве. *Международный вестник ветеринарии*. 2022; (3): 37–42. <https://doi.org/10.52419/issn2072-2419.2022.3.37>
- Maciucă I.E. et al. Genetic Features of *mcr-1* Mediated Colistin Resistance in CMY-2-Producing *Escherichia coli* From Romanian Poultry. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 2267. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02267>
- Ebrahim A.F., El-Demerdash A.S., Orady R.M., Nabil N.M. Modulatory Effect of Competitive Exclusion on the Transmission of *ESBL E. coli* in Chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2023. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10095-1>
- Li T., Castañeda C.D., Miotto J., McDaniel C., Kiess A.S., Zhang L. Effects of *in ovo* probiotic administration on the incidence of avian pathogenic *Escherichia coli* in broilers and an evaluation on its virulence and antimicrobial resistance properties. *Poultry Science*. 2021; 100(3): 100903. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.072>
- Празднова Е.В. Антимутагенное действие пробиотиков как основа их биологического эффекта. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Ростов-на-Дону. 2020; 266. <https://www.elibrary.ru/xevouf>
- Alam M.K., Alhazmi A., DeCoteau J.F., Luo Y., Geyer C.R. RecA Inhibitors Potentiate Antibiotic Activity and Block Evolution of Antibiotic Resistance. *Cell Chemical Biology*. 2016; 23(3): 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.02.010>
- Nuotio L., Schneitz C., Nilsson O. Effect of competitive exclusion in reducing the occurrence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the ceca of broiler chicks. *Poultry Science*. 2013; 92(1): 250–254. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02575>
- Saliu E.-M., Vahjen W., Zentek J. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in poultry. *Animal Health Research Reviews*. 2017; 18(1): 46–57. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000020>

REFERENCES

- Smith J.A. Broiler production without antibiotics: United States field perspectives. *Animal Feed Science and Technology*. 2019; 250: 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2018.04.027>
- Phillips I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 53(1): 28–52. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg483>
- Nityaga I.M., Telegina S.A., Galushko D.P. Monitoring of antibiotics of the tetracycline group in meat and meat products from poultry in order to prevent their contamination. *Scientific news*. 2022; 26: 284–288 (in Russian). <https://www.elibrary.ru/vkaiyh>
- Merezhko O.E., Stanishevskaya N.B. Microorganisms resistance formation in feeds supplemented with antibiotics. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2015; (2): 174–176 (in Russian). <https://www.elibrary.ru/tschhb>
- Argudin M.A. et al. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics*. 2017; 6(2): 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6020012>
- Al-Kharousi Z.S., Guizani N., Al-Sadi A.M., Al-Bulushi I.M. Antibiotic Resistance of *Enterobacteriaceae* Isolated from Fresh Fruits and Vegetables and Characterization of their AmpC β -Lactamases. *Journal of Food Protection*. 2019; 82(11): 1857–1863. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-089>
- Dolliver H., Kumar K., Gupta S. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. *Journal of Environmental Quality*. 2007; 36(4): 1224–1230. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0266>
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Fedorchuk V.V., Grudinina S.A., Krotova L.A., Cherkashin E.A., Sidorenko S.V., Tishkov V.I. The role of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV in *Streptococcus pneumoniae* resistance to fluorquinolones. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2002; 43(6): 349–352 (in Russian). <https://www.elibrary.ru/evgzvf>
- Liu Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016; 16(2): 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Rubab M., Oh D.-H. Molecular Detection of Antibiotic Resistance Genes in Shiga Toxin-Producing *E. coli* Isolated from Different Sources. *Antibiotics*. 2021; 10(4): 344. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040344>
- Ma B., Wang D., Mei X., Lei C., Li C., Wang H. Effect of Enrofloxacin on the Microbiome, Metabolome, and Abundance of Antibiotic Resistance Genes in the Chicken Cecum. *Microbiology Spectrum*. 2023; 11(2): e04795-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04795-22>
- Pereira R.V. et al. Genotypic antimicrobial resistance characterization of *E. coli* from dairy calves at high risk of respiratory disease administered enrofloxacin or tulathromycin. *Scientific Reports*. 2020; 10: 19327. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76232-w>
- Niero G., Bortolaia V., Vanni M., Intorre L., Guardabassi L., Piccirillo A. High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. *Veterinary Microbiology*. 2018; 216: 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.012>
- Crecencio R.B. et al. Antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genetic profiles of *Escherichia coli* isolated from retail chicken meat. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020; 84: 104355. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104355>
- Makavchik S.A., Pushkina V.S., Krotova A.L. Detection of *Escherichia coli* with beta-lactamase production and problems of antibiotic therapy in poultry farming. *International Journal of Veterinary Medicine*. 2022; (3): 37–42 (in Russian). <https://doi.org/10.52419/issn2072-2419.2022.3.37>
- Maciucă I.E. et al. Genetic Features of *mcr-1* Mediated Colistin Resistance in CMY-2-Producing *Escherichia coli* From Romanian Poultry. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 2267. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02267>
- Ebrahim A.F., El-Demerdash A.S., Orady R.M., Nabil N.M. Modulatory Effect of Competitive Exclusion on the Transmission of *ESBL E. coli* in Chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2023. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10095-1>
- Li T., Castañeda C.D., Miotto J., McDaniel C., Kiess A.S., Zhang L. Effects of *in ovo* probiotic administration on the incidence of avian pathogenic *Escherichia coli* in broilers and an evaluation on its virulence and antimicrobial resistance properties. *Poultry Science*. 2021; 100(3): 100903. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.072>
- Prazdnova E.V. Antimutagenic action of probiotics as a core biological effect. *Doc. (Biology) Theses*. Rostov-on-Don. 2020; 266 (in Russian). <https://www.elibrary.ru/xevouf>
- Alam M.K., Alhazmi A., DeCoteau J.F., Luo Y., Geyer C.R. RecA Inhibitors Potentiate Antibiotic Activity and Block Evolution of Antibiotic Resistance. *Cell Chemical Biology*. 2016; 23(3): 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.02.010>
- Nuotio L., Schneitz C., Nilsson O. Effect of competitive exclusion in reducing the occurrence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the ceca of broiler chicks. *Poultry Science*. 2013; 92(1): 250–254. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02575>
- Saliu E.-M., Vahjen W., Zentek J. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in poultry. *Animal Health Research Reviews*. 2017; 18(1): 46–57. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000020>

ОБ АВТОРАХ

Дарья Георгиевна Тюрина

кандидат экономических наук
tiurina@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9001-2432>

Елена Павловна Горфункель

ветеринарный контролер
elena@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6843-8733>

Валентина Анатольевна Филиппова

биотехнолог
filippova@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8789-9837>

Георгий Юрьевич Лаптев

доктор биологических наук
laptev@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8795-6659>

Наталья Ивановна Новикова

кандидат биологических наук
novikova@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9647-4184>

Елена Александровна Йылдырым

доктор биологических наук
deniz@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5846-5105>

Лариса Александровна Ильина

доктор биологических наук
ilina@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2789-4844>

Андрей Валерьевич Дубровин

кандидат ветеринарных наук
dubrovin@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8424-4114>

Алиса Сергеевна Дубровина

биотехнолог
dasvet@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4336-8273>

Ксения Андреевна Калиткина

биотехнолог
ksenya.k.a@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9541-6839>

Василий Александрович Заикин

биотехнолог
dfcx@biotrof.ru
<https://orcid.org/0009-0006-8029-9955>

Екатерина Сергеевна Пономарева

биотехнолог
kate@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4336-8273>

Алеся Анисовна Савичева

технолог
sava@biotrof.ru
<https://orcid.org/0009-0007-9125-8005>

Наталья Сергеевна Патюкова

технолог
nap@biotrof.ru
<https://orcid.org/0009-0002-0948-7479>

ООО «БИОТРОФ»,
ул. Малиновская, 8А, пом. 7-Н, Пушкин, Санкт-Петербург, 196602,
Россия

ABOUT THE AUTHORS

Daria Georgievna Tiurina

Candidate of Economical Sciences
tiurina@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9001-2432>

Elena Pavlovna Gorfunkel

Veterinary Attendant
elena@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6843-8733>

Valentina Anatolievna Filippova

Biotechnologist
filippova@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8789-9837>

George Yurievich Laptev

Doctor of Biological Sciences
laptev@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8795-6659>

Natalia Ivanovna Novikova

Candidate of Biological Sciences
novikova@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9647-4184>

Elena Alexandrovna Yildirim

Doctor of Biological Sciences
deniz@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5846-5105>

Larisa Alexandrovna Ilyina

Doctor of Biological Sciences
ilina@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2789-4844>

Andrey Valerievich Dubrovin

Candidate of Veterinary Sciences
dubrovin@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8424-4114>

Alisa Sergeevna Dubrovina

Biotechnologist
dasvet@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4336-8273>

Xenia Andreevna Kalitkina

Biotechnologist
ksenya.k.a@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9541-6839>

Vasily Alexandrovich Zaikin

Biotechnologist
dfcx@biotrof.ru
<https://orcid.org/0009-0006-8029-9955>

Ekaterina Sergeevna Ponomareva

Biotechnologist
kate@biotrof.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4336-8273>

Alesya Anisovna Savicheva

Technologist
sava@biotrof.ru
<https://orcid.org/0009-0007-9125-8005>

Natalia Sergeevna Patyukova

Technologist
nap@biotrof.ru
<https://orcid.org/0009-0002-0948-7479>

BIOTROF Ltd.,
8A Malinovskaya Str., room 7-N, Pushkin, St. Petersburg, 196602,
Russia