

Михайловская Вероника Сергеевна

БАКТЕРИОЦИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ *ESCHERICHIA COLI*: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2026

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь.

Научный руководитель

Кузнецова Марина Валентиновна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, профессор, исполняющая обязанности заведующего кафедрой микробиологии и клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Каюмов Айрат Рашитович, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Николенко Марина Викторовна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (460014, г. Оренбург, ул. Набережная, 29).

Защита состоится «18» декабря 2026 г. в _____ на заседании диссертационного совета 24.1.201.03 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegmn.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ПФИЦ УрО РАН (614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permisc.ru>).

Автореферат разослан «_____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Вид бактерий *Escherichia coli* неоднороден и включает комменсальные, экстраинтестинальные и диареогенные варианты. Комменсальные *E. coli* являются субдоминантными представителями нормальной микрофлоры кишечника животных и человека, составляя 1-2% флоры *Pseudomonadota*. Экстраинтестинальные *E. coli* являются условно-патогенными, поскольку при транслокации в другие биотопы могут вызывать инфекционные заболевания, например, стать причиной гнойно-воспалительных процессов в мочевыделительной системе, желчных путях, органах дыхания. Диареогенные *E. coli* вызывают различные виды острых кишечных инфекций. Одним из ключевых факторов конкурентоспособности всех представителей вида *E. coli* считаются бактериоцины – белковые или пептидные токсины, подавляющие рост близкородственных бактерий. Многочисленные теоретические и экспериментальные исследования показали, что продуценты бактериоцинов имеют преимущество в сравнении с непродуцентами при колонизации одной и той же экологической ниши (Dobson *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2025). Несмотря на значительный объем исследований, посвященных бактериоцинам *E. coli*, ряд важных вопросов остается недостаточно изученным. Распространенность отдельных генов бактериоцинов в коллекциях *E. coli* различного происхождения документирована в ряде исследований (Gordon, O'Brien, 2006; Smith *et al.*, 2019; Mazurek-Porczyk *et al.*, 2020), однако комплексные данные о молекулярно-генетическом разнообразии бактериоцинов с одновременной оценкой фенотипа продукции, факторов патогенности, устойчивости к антибиотикам и мобильных элементов представлены, преимущественно, для отдельных групп штаммов и часто без учета эколого-патотипического контекста. Ассоциации между бактериоциногенностью и генами вирулентности описаны в нескольких работах, однако результаты противоречивы: в одних исследованиях бактериоцин-продуцирующие штаммы характеризуются повышенным патогенным потенциалом (Dobson *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2025), в других – такой связи не обнаружено (Ghazaryan *et al.*, 2019). Вопрос о том, являются ли бактериоцины самостоятельными факторами патогенности или маркерами определенных патотипов, остается дискуссионным. В контексте разработки пробиотических препаратов бактериоцин-продуцирующие непатогенные *E. coli* привлекают внимание благодаря способности подавлять рост близкородственных патогенных бактерий и модулировать состав микрофлоры (Sassone-Corsi *et al.*, 2016). С учетом глобальной проблемы роста устойчивости к антибиотикам среди представителей *Enterobacterales* и дефицита новых антибактериальных препаратов, бактериоцины рассматриваются как перспективная альтернатива или дополнение к традиционной антимикробной терапии. Однако внедрение штаммов-продуцентов бактериоцинов в клиническую и ветеринарную практику требует тщательной оценки биобезопасности. Растущий интерес к технологиям на основе живых микробных систем, сочетающих антагонизм к патогенам, способность формировать колонизационную резистентность и иммуномодулирующее действие, определяет актуальность исследований.

Целью настоящей работы являлось изучение молекулярно-генетического разнообразия бактериоцинов экстраинтестинальных патогенных и комменсальных *Escherichia coli*, а также обоснование возможности применения комменсальных бактериоцин-продуцирующих *E. coli* для контроля энтеробактериальных инфекций.

Основные задачи исследования:

1. Изучить распространенность продукции и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов уropатогенных (UPEC), патогенных для птиц (APC) и выделенных от здоровых животных и птиц комменсальных *E. coli*.
2. Проанализировать распространенность генетических детерминант факторов патогенности (токсинов, адгезинов, систем захвата железа, островов патогенности), генов устойчивости к антибиотикам, мобильных генетических элементов у штаммов *E. coli* и связь перечисленных признаков с фенотипом и генотипом продукции бактериоцинов.
3. Дать комплексную характеристику перспективных для биотехнологического применения штаммов *E. coli*, включая анализ их геномов, оценку адгезивных свойств, гидрофобности клеточной поверхности, взаимодействия с представителями комменсальной

микробиоты (*Lactobacillus* spp.) и антагонистической активности в отношении условно-патогенных штаммов *in vitro*.

4. Оценить безопасность и защитный эффект отобранных штаммов *E. coli* в модели экспериментальной токсикоинфекции *in vivo*.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное сравнение распространенности и молекулярно-генетического разнообразия бактериоцинов для исследованных коллекций штаммов *E. coli*: уропатогенных (UPEC), патогенных для птиц (APEC) и комменсальных *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц. Впервые показано, что профили бактериоцинов структурированы по эколого-патотипической принадлежности штаммов. APEC характеризовались высокой продукцией и представленностью бактериоцинов с доминированием микроцина B17 и колицина M, тогда как комменсальные *E. coli* отличались доминированием пороформирующих бактериоцинов, а уропатогенные *E. coli* – микроцинов-сидерофоров M и H47. Показано, что, несмотря на общую экстраинтестинальную природу UPEC и APEC, последние формировали обособленную группу по профилям генов продукции бактериоцинов. Впервые установлены региональные особенности распространенности генов патогенности, антибиотикорезистентности и мобильных генетических элементов у *E. coli* различного происхождения. Показано, что комменсальные штаммы, выделенные от здоровых животных, несли широкий и разнообразный набор генов патогенности и устойчивости к антибиотикам, включая гены β -лактамаз расширенного спектра. Полученные данные подтверждают, что штаммы *E. coli* служат маркером распространения этих генов среди людей, животных, а также в объектах окружающей среды. Это указывает на необходимость системного мониторинга штаммов *E. coli*. Установлено, что бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы обладают более выраженным набором факторов патогенности, чаще кодируют токсины, адгезины и системы захвата железа, что указывает на ассоциацию между бактериоциногенностью и высоким патогенным потенциалом, возможную ко-селекцию этих признаков. Выявлен штамм *E. coli* C51 с исключительным для исследованной коллекции профилем: девятью плазмидами и шестью локусами бактериоцинов, что демонстрирует сложную организацию генома и роль плазмид в совместном распространении генов, повышающих адаптивный потенциал бактерий. Впервые показано, что среди комменсальных *E. coli*, выделенных от здоровых животных, встречаются штаммы, несущие серологические маркеры, характерные для энтеропатогенных вариантов, но не содержащие генов энтеротоксинов, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных для создания «пробиотических вакцин». Впервые получены полные последовательности геномов штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41, которые продемонстрировали высокий биотехнологический потенциал по результатам исследований *in vitro* и *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты настоящего исследования расширяют представление о роли бактериоцинов в экологии и эволюции *E. coli*. Получены новые данные о том, что репертуар бактериоцинов не является случайным признаком, а структурирован по эколого-патотипической принадлежности штаммов: UPEC, APEC и комменсальные штаммы характеризовались специфическими профилями бактериоцинов, что указывает на адаптивную роль этих факторов в различных нишах (мочевыводящие пути человека, органы птиц во время активной инфекции, желудочно-кишечный тракт животных). Эти данные подчеркивают, что профили бактериоцинов следует рассматривать не только как маркеры антагонистической активности, но и как индикаторы наличия у штаммов (в том числе патогенных) механизмов защиты от бактериоцинов. Такая информация имеет практическое значение и должна учитываться при конструировании новых препаратов на основе бактериоцинов и бактериоцин-продуцирующих бактерий. Полученные сведения о профилях бактериоцинов, генов токсинов, адгезинов, систем захвата железа, маркеров островов патогенности, генов антибиотикорезистентности и мобильных генетических элементов вносят вклад в понимание эволюционной динамики и меняющейся генетической архитектуры клинических и полевых штаммов *E. coli*, а также возможных механизмов ко-селекции признаков. Данные о связи между бактериоциногенностью и перечисленными признаками патогенности поддерживают концепцию о роли бактериоцинов в формировании общего конкурентного и патогенного потенциала штаммов. Дополнительную научную значимость представляют сформированные коллекции детально охарактеризованных комменсальных штаммов

E. coli. Эти культуры могут быть использованы для изучения межбактериальной конкуренции, механизмов колонизации, проведения сравнительных геномных и фенотипических исследований. Практическая значимость работы заключается в том, что полученные штаммы представляют интерес как продуценты уникальных бактериоцинов и других биологически активных соединений, а отдельные изоляты с благоприятным профилем безопасности могут служить основой для дальнейшей разработки пробиотических препаратов и иных биотехнологических продуктов. Для *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 была проведена комплексная оценка биотехнологического потенциала как штаммов с высокой антагонистической активностью в отношении условно-патогенных бактерий *in vitro*, благоприятным профилем биобезопасности и защитным эффектом *in vivo*. Эти штаммы могут быть использованы в качестве основы для разработки отечественных пробиотических препаратов для ветеринарии и, потенциально, для медицины. Штаммы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 были депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (Пушино, Россия) под номерами ВКМ В-3706Д и ВКМ В-3707Д соответственно; в базу данных GenBank были депонированы их геномы под номерами SAMN35637330 и SAMN35637331 соответственно. Получены патенты: «Штамм бактерий *Escherichia coli* C41 для получения пробиотического препарата для профилактики колибактериоза сельскохозяйственных животных» (Патент № 2807738 С1) и «Штамм бактерий *Escherichia coli* Q5, перспективный для получения пробиотического препарата для профилактики колибактериоза сельскохозяйственной птицы» (Патент № 2806907 С1).

Методология и методы исследования. Объектом исследования являлись штаммы *E. coli* разных эколого-патотипических групп лабораторной коллекции Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН, Пермь), выделенные ранее из образцов мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей, органов птиц с признаками колибактериоза, содержимого кишечника здоровых животных и птиц сельскохозяйственных предприятий Пермского края. Неклональность штаммов была установлена в системе двойного контроля с помощью гер-ПЦР. Способность штаммов к продукции бактериоцинов оценивалась методом отсроченного антагонизма в отношении *E. coli* DH5α. Детекцию генов бактериоцинов, токсинов, адгезинов, факторов захвата железа, маркеров островов патогенности, мобильных генетических элементов, генов устойчивости к антибиотикам осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фенотип устойчивости к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. Для выбранных штаммов выполняли полногеномное секвенирование на платформе Oxford Nanopore MinION. Уровень неспецифической адгезии штаммов оценивали в отношении гидрофобной (пластик) и гидрофильной поверхности (стекло), уровень специфической адгезии – в отношении эритроцитов человека и животных. Гидрофобность клеточной стенки определяли методом разделения в системе гексадекан-водная фаза. Выживаемость штаммов в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт, оценивали при инкубации в средах с различным pH в присутствии пепсина. Антагонистическую активность бесклеточных культуральных жидкостей оценивали в отношении условно-патогенных бактерий. Оценку безопасности и протекторной активности отобранных штаммов проводили на лабораторных животных (крысы линии Wistar) в модели экспериментальной инфекции, вызванной токсигенным штаммом *E. coli* C55 (*stx1*, *eaeA*, *ehxA*, *hem⁺*, *Amp^R*). Оценивали выживаемость, динамику массы тела, изменение биохимических и гематологических показателей, морфологии ткани кишечника и печени, количества основных представителей кишечной микробиоты. Протокол исследования на животных был одобрен этическим Комитетом ИЭГМ УрО РАН (протокол №19/2, дата утверждения 22.02.23).

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность полученных данных подтверждается значительным количеством технических и биологических повторов. Использованные методики соответствуют международным стандартам и были реализованы на современном оборудовании и программном обеспечении. Выводы сделаны на основании общепринятых методов статистической обработки данных по результатам постановки трех и более независимых экспериментов. Результаты работы опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, представлены на всероссийских и международных конференциях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Распространенность и молекулярно-генетическое разнообразие бактериоцинов *E. coli* зависят от эколого-патотипической принадлежности штаммов: патогенные для птиц *E. coli* (АРЕС) характеризуются высокой представленностью и специфическим профилем бактериоцинов, тогда как уропатогенные (UPEC) и комменсальные *E. coli* имеют более гетерогенные профили с доминированием микроцинов-сидерофоров и пороформирующих бактериоцинов соответственно.

2. Наличие генов и фенотипическая продукция бактериоцинов тесно ассоциированы с рядом факторов патогенности *E. coli*, а также генами устойчивости к антибиотикам и мобильными генетическими элементами, что важно учитывать для оценки биобезопасности бактериоцин-продуцирующих штаммов.

3. Бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 обладают комплексом значимых в биотехнологическом отношении признаков: их экзометаболиты проявляют антагонистическую активность в отношении устойчивых к антибиотикам штаммов АРЕС и диареегенных *E. coli*; штаммы обладают более высокой адгезией к эритроцитам животных, чем человека; благоприятным профилем биобезопасности *in silico*.

4. Бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 безопасны *in vivo* и обладают защитным эффектом от патогенного воздействия токсигенного штамма *E. coli* C55 в модели экспериментальной инфекции.

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоял в анализе доступной литературы, планировании и постановке экспериментов, анализе и статистической обработке результатов, написании текста диссертации, патентов и публикаций. Основные результаты были получены автором, либо при его непосредственном участии. Полногеномное секвенирование штаммов было выполнено на базе и при участии сотрудников лаборатории анализа метагеномов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена Российской академии наук» (Москва). Эксперименты *in vivo* были проведены на базе и при участии сотрудников Центральной научно-исследовательской лаборатории «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» (Пермь).

Апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, включая 8 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских конференций, 8 экспериментальных статей, в том числе 7 статей в журналах, входящих в международные базы цитирования Web of Science, Scopus, 1 статья в журнале РИНЦ. Получено 2 патента на изобретение.

Связь работы с научными программами. Работа выполнена в рамках НИОКТР «Биоразнообразие микроорганизмов антропогенно-загрязненных экосистем и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды» (№124020500028-4); при поддержке РФФИ «Биопленкообразование *Escherichia coli* как триггер катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей» (№ 19-44-590014-р_а, 2019-2021); в рамках научного проекта, выполняемого международными исследовательскими группами ученых на базе государственных образовательных организаций высшего образования и (или) научных организаций Пермского края: «Усовершенствование методов антимикробной защиты на предприятиях молочного и мясного животноводства с целью контроля над распространением бактериальных инфекций» (№С-26/541, 2021-2023); при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фондом содействия инновациям) в рамках программы «Студенческий стартап» (№3755ГССС15 L/99785, 2024-2025).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 24 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 109 литературных источников, в том числе 4 отечественных и 105 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность своему научному руководителю д.м.н., профессору Кузнецовой М.В., а также сотрудникам лаборатории анализа метагеномов Института биологии гена РАН, кафедры микробиологии и клинической лабораторной диагностики, кафедры гистологии и центральной научно-исследовательской лаборатории ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера за помощь в проведении экспериментов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные изоляты и штаммы. Объектами исследования были изоляты уропатогенной *E. coli* (UPEC) (n=177), выделенные из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей; штаммы птичьих патогенных *E. coli*, выделенные из органов цыплят-бройлеров с признаками колибактериоза (APEC) (n=28); штаммы *E. coli*, выделенные из фекалий сельскохозяйственных птиц (n=16), а также сельскохозяйственных животных (n=56). Для оценки антагонистической активности использовали тест-штаммы: *E. coli* DH5 α , патогенные для птиц *E. coli* (*E. coli* BR4, *E. coli* BR35, *E. coli* BR37, «Ex culture collection», Словения), диареогенные *E. coli* (*E. coli* CA29, *E. coli*, CA43, *E. coli* CA46) и *Salmonella enterica* serotype Typhimurium №1135 (лабораторная коллекция ИЭГМ УрО РАН, Пермь), а также *E. coli* O157, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Shigella flexneri* №170, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* №Н-237 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва). В работе использовали пробиотические штаммы *E. coli* М-17, *L. fermentum* 90Т-С4, *L. plantarum* 8Р-А3, *L. acidophilus* КЗШ24 («Пермское НПО «Биомед» филиал АО «НПО «Микроген», Пермь), а также токсигенный штамм *E. coli* C55 (*stx1*, *east1*, *ehxA*, *hem*⁺, *Amp*^R) из лабораторной коллекции ИЭГМ УрО РАН для моделирования инфекции *in vivo*. Штаммы *Lactobacillus* spp. выращивали в жидкой питательной среде МРС-5 (НИЦФ, Россия) или LART, прочие использованные штаммы – в богатой питательной среде Лурия-Бертани (LB-среда, «Amresco», США) при 37 °C.

Детекция генов методом ПЦР. ДНК выделяли методом термолизиса: биомассу бактерий в сверхчистой воде прогревали 15 мин при 97 °C в термостате «Термит» (Россия), пробы охлаждали, центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин. Детектировали гены микроцинов B17, H47, J25, V, M, C7, L и колицинов A, B, D, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, Ia, Ib, Js, K, M, N, S4, U, Y, 5, 10; гены адгезинов (*afa/draBC*, *fimH*, *papC*, *sfaDE*, *upaG*, *flu*), токсинов (*hlyA*, *hlyF*, *eastI*, *eltA*, *estI*, *estII*, *stx1*, *stx2*, *ehxA*, *cnf1*, *clbA*), протектинов (*iss*, *ompT*, *kpsMTII*), белков систем поглощения железа (*ihfA*, *chuA*, *iroN*, *iutA*); маркеров островов патогенности (*irp2*, *iutA*, *tia*, *espC*, *pic*, *eaeA*, *lifA/efal*); генов β -лактамаз (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}), устойчивости к тетрациклинам (*tetA*, *tetB*, *tetM*, *tet(X)*), хлорамфениколу (*cmlA*, *catA1*, *floR*), фторхинолонам (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*) и аминогликозидам (*aacC2*); гена-регулятора конъюгативного переноса (*traJ*) и интегронов класса I. Видовую принадлежность к *E. coli* подтверждали детекцией гена β -глюкуронидазы (*uidA*), неклональность изолятов – с помощью гер-ПЦР с праймерами ERIC1/2. Синтезировали праймеры (ООО «Евроген», Россия) и использовали протоколы амплификации согласно рекомендациям авторов. Амплификацию проводили в реакционных смесях объемом 20 мкл, содержащих 3 мкл матричной ДНК, по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров с концентрацией 10 мкМ, а также готовую реакционную смесь 5X ScreenMix (ООО «Евроген», Россия). Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле («ДиаГен», Россия). Гели окрашивали бромистым этидием, визуализировали и документировали результаты с помощью системы Gel-DocXR («Bio-Rad», США).

Полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ были выполнены на базе и при участии сотрудников лаборатории анализа метагеномов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена РАН» (Москва). Секвенирование ДНК проводили на платформе Oxford Nanopore Technologies. Поккрытие составило 132х-188х, качество прочтений всех последовательностей 99,9% (вероятность неправильного нуклеотида 0,1%). Черновые сборки геномов получали с использованием Flye 2.9.1, аннотировали с использованием PGAP 6.1. Необработанные чтения последовательностей геномов были депонированы в Sequence Read Archive (SRA), аннотированные сборки геномов – в NCBI BioProject. Штаммы и номера доступа: *E. coli* Q5 (CP127255-CP127260), C25 (CP127314-CP127315), C51 (CP127304-CP127313), Ch1 (CP127316-CP127320), C41 (CP127252-CP127254), APEC20/16 (CP127297-CP127300), APEC37 (CP127301-CP127303).

Обнаружение продукции бактериоцинов методом отсроченного антагонизма проводили с помощью техники «двойного слоя» (Budič *et al.*, 2011) с использованием *E. coli* DH5 α в качестве чувствительного тест-штамма. Контрольным был рекомбинантный штамм *E. coli* ЖР со встроенным в плазмиду геном колицина E7 (Starčič Erjavec *et al.*, 2015; Кузнецова и др., 2017). На агаризованной

LB-среде выращивали колонии каждого штамма *E. coli*. Выросшие колонии обрабатывали парами хлороформа. Поверх исследуемых культур наслаивали полужидкую 0,6% агаризованную LB-среду, содержащую 24-часовую культуру тест-штамма *E. coli* DH5 α . Чашки инкубировали в термостате при 37 °C в течение 24 ч. Измеряли диаметры зон лизиса *E. coli* DH5 α .

Оценку антагонистической активности бесклеточных культуральных жидкостей бактериоцин-продуцирующих *E. coli* на рост патогенных и условно-патогенных тест-штаммов проводили согласно методу отсроченного антагонизма в жидкой питательной среде на базе кафедры микробиологии и вирусологии «ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера» (Пермь). Бактериоцин-продуцирующие штаммы культивировали в течение ночи в жидкой среде LB при 37 °C без аэрации, затем центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин. Полученные супернатанты стерилизовали с использованием мембранных фильтров Millex®-GS с диаметром пор 0,22 мкм («Merck Milli pore Ltd», Ирландия). Тест-штаммы выращивали в среде LB в течение ночи, затем разводили до 10⁶ КОЕ/мл и добавляли (в соотношении 1:1) в лунки 96-луночных микропланшетов, содержащие культуральные жидкости 24-часовых бактериоцин-продуцирующих *E. coli*. Планшеты инкубировали без встряхивания в течение 24 часов при температуре 37 °C. Затем измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀) с помощью планшетного ридера Power Wave X (Instrumentals Inc., США) и рассчитывали процент подавления роста после 6 и 22 часов совместного культивирования.

Оценку антагонистической активности *Lactobacillus* spp. в отношении *E. coli* проводили методом штрихов на плотной питательной среде. Исследуемые культуры *L. fermentum* 90T-C4, *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* K3Ш24 высевали штрихами на агаризованную среду МРС-5 или LART по диаметру чашки Петри. Инкубировали в течение 4 суток при 37 °C. Перпендикулярно зоне роста лактобактерий подсеивали культуры *E. coli*, инкубировали при температуре 37 °C в течение суток. Результаты оценивали путем измерения зоны задержки роста *E. coli*.

Оценка выживаемости бактерий в модельной среде желудка. Использовали модельную среду, имитирующую желудочный сок (HCl в концентрации 0,05 или 0,1%, пепсин – 0,5 г/л, pH 2,8±0,1). Культуры *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 выращивали в течение суток в среде LB, культуры *L. fermentum* 90T-C4, *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* K3Ш24 – в течение 4 суток в среде МРС-5. В имитированную среду добавляли суспензии клеток бактерий в концентрации 1×10⁶ КОЕ/мл, либо композицию *E. coli* C41 и *L. acidophilus* K3Ш24 в соотношении 1:1. Инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Затем готовили последовательные десятикратные разведения, которые высевали на агаризованную среду Эндо и/или МРС-5, инкубировали при 37 °C в течение 24 или 48 часов соответственно. Учитывали количество выросших колоний *E. coli* (на среде Эндо) и *Lactobacillus* spp. (на среде МРС-5), определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

Оценка гемолитической и лизогенной активности. **Оценку гемолитической активности** штаммов проводили путем посева штрихом на 5% кровяной агар с последующей инкубацией при 37 °C в течение 24 часов («Пермское НПО «Биомед» филиал АО «НПО «Микроген», Россия). О наличии гемолитической активности судили по просветлению среды вокруг штриха. **Лизогенную активность** определяли методом индукции бактериофага ультрафиолетовым излучением (УФ), в качестве чувствительной тест-культуры использовали *E. coli* DH5 α . О лизогенной активности судили по появлению стерильных «бляшек».

Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом проводили согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ, версия 2018-03) с использованием дисков производства Научно-исследовательского центра фармакотерапии (НИЦФ, Россия).

Оценка гидрофобности, неспецифической и специфической адгезии. **Гидрофобность** клеточной поверхности определяли методом распределения бактерий в системе гексадекан-водная фаза, измеряя OD₆₀₀ водной фазы. **Определение уровня неспецифической адгезии** проводили в стеклянных пенициллиновых флаконах (гидрофильная поверхность) и в полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетах (гидрофобная поверхность) («Медполимер», Россия) согласно (Николаев, 2000). Под величиной (индексом) неспецифической адгезии понимали снижение оптической плотности суспензии клеток бактерий после инкубации. **Исследование специфической**

адгезии бактерий к эритроцитам человека и коров проводили по методу Брилиса (Brilis *et al.*, 1986). Использовали эритроциты человека О (I) группы крови Rh (+), а также эритроциты коров. При оптической микроскопии препаратов учитывались три показателя: средний индекс адгезии (от англ. *average adhesion index*, AAI), который рассчитывался как среднее количество микроорганизмов, прикрепленных к поверхности одного эритроцита; коэффициент адгезии (от англ. *adhesion coefficient*, AC) – процент эритроцитов, содержащих бактерии на поверхности; индекс адгезивности микроорганизмов к поверхности эритроцитов (от англ. *index adhesiveness of microorganisms*, IAM) – отношение AAI к AC. В зависимости от значений IAM микроорганизмы были классифицированы как: неадгезивные ($IAM \leq 1,75$), низкоадгезивные ($IAM = 1,76-2,49$), среднеадгезивные ($IAM = 2,50-3,99$) или высокоадгезивные ($IAM \geq 4,0$).

Дизайн эксперимента *in vivo*. Суспензии бактерий *E. coli* Q5, *E. coli* C41 и *E. coli* C55 для перорального введения крысам готовили следующим образом: бактерии выращивали в бульоне LB в течение 24 часов при температуре 37 °С, затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в физиологическом растворе, доводили до конечной концентрации 5×10^8 или 5×10^{10} КОЕ/мл. Для экспериментов использовали 48 самцов белых крыс линии Wistar в возрасте 180 дней. Протокол исследования на животных был одобрен этическим Комитетом ИЭГМ УрО РАН (протокол №19/2, дата утверждения 22.02.23). Содержание и уход за животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33215 2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Окружающая среда, помещения и организация содержания». В течение всего эксперимента животные имели свободный доступ к корму в виде стандартных гранул и питьевой воде (*ad libitum*). Животных случайным образом распределяли на шесть экспериментальных групп. Крысам вводили потенциальные пробиотические штаммы *E. coli* Q5 или *E. coli* C41 (ежедневно в течение 5 дней в дозах 5×10^8 или 5×10^{10} КОЕ/крыса), с последующим однократным пероральным введением части животных токсигенного штамма *E. coli* C55 (*stx1*, *eaeA*, *ehxA*, *hem⁺*, *Amp^R*) в дозе 5×10^8 КОЕ/крыса. Дизайн эксперимента представлен в Таблице 1. Массу тела крыс регистрировали до начала эксперимента, после введения пробиотических бактерий, а для второй, третьей и четвертой групп – дополнительно после инфицирования штаммом *E. coli* C55.

Таблица 1 – Дизайн эксперимента *in vivo*

Экспериментальные группы крыс						
Время, дни	Контроль (n=10)	Контроль инфекции (n=5)	<i>E. coli</i> Q5, 5×10 ⁸ КОЕ (n=10)	<i>E. coli</i> C41, 5×10 ⁸ КОЕ (n=10)	<i>E. coli</i> Q5, 5×10 ¹⁰ КОЕ (n=5)	<i>E. coli</i> C41, 5×10 ¹⁰ КОЕ (n=5)
0	измерение массы тела					
1-4	введение физ. раствора		введение <i>E. coli</i> Q5 или <i>E. coli</i> C41			
5	измерение массы тела					
	эвтаназия (n=5)	—	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)
	введение <i>E. coli</i> C55, 5×10 ⁸ КОЕ				—	
6-7	мониторинг состояния животных					
8	измерение массы тела					
	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)	эвтаназия (n=5)		

Анализ гематологических, биохимических показателей и гистологические исследования. Анализ количества эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, в том числе лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, концентрации гемоглобина, гематокрита в крови проводили с использованием автоматизированного гематологического анализатора (MINDRAY BS-3600, Китай). В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы, общего белка, креатинина, мочевины, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, креатинина с помощью биохимического

анализатора (MINDRAY BS-200, Китай). Образцы тканей кишечника и печени фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, заливали в парафин «Гистомикс» («BioVitrum», Россия). Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином («BioVitrum», Россия), результаты оценивали под световым микроскопом (Olympus, Япония).

Бактериологический анализ микробиоты кишечника крыс. Бактериологический анализ микробиоты кишечника проводили методом прямого посева образцов фекалий крыс на селективные питательные среды. После заражения крыс штаммом *E. coli* C55 (hem⁺, Amp^R) фекалии высевали на кровяной агар с ампициллином. Определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Полученные КОЕ пересчитывали на 1 г фекалий.

Статистический анализ и визуализация данных. Первичная обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2021 (Microsoft Corporation, США). Статистический анализ и визуализация данных были выполнены с использованием GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США) и Python (v. 3.11). Данные представлены в виде медианы (Me) с межквартильным диапазоном [Q1–Q3]. Использовались следующие статистические тесты: t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни, однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), тест Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность, точный критерий Фишера, критерий χ^2 , метод Бенджамини-Хохберга для корректировки *p*-значений в случае множественных сравнений, тест ранговой корреляции Спирмена, также рассчитывали отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (95% CI). Значение *p* менее 0,05 считалось значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ И КОММЕНСАЛЬНЫХ *E. COLI*

Разнообразие бактериоцинов *E. coli* различных эколого-патотипических групп. Установлено, что спектр генов бактериоцинов зависит от источника выделения и патотипа *E. coli*. Выявлено, что АРЕС чаще были позитивны по фенотипу продукции бактериоцинов и содержали больше генов бактериоцинов, чем комменсальные *E. coli* кишечника животных и UPEC (Рисунок 1А, Б, В). Обнаружено, что штаммы, несущие гены микроцинов-сидерофоров М и Н47, более распространены в группе UPEC, чем АРЕС (Kuznetsova *et al.*, 2025). В группе АРЕС доминировали носители гена микроцина В17, ингибирующего ДНК-гиразу, среди комменсальных *E. coli*, выделенных от животных – носители генов пороформирующих бактериоцинов (Таблица 2).

Таблица 2 – Распространенность генов биосинтеза бактериоцинов среди штаммов *E. coli*

Бактериоцины	Количество штаммов <i>E. coli</i> , несущих гены бактериоцинов, n (%)				
	ExPEC		Комменсальные		Всего (n=277)
	UPEC (n=177)	АРЕС (n=28)	животных (n=56)	птиц (n=16)	
MccB17	10 (5,6)	21 (75,0)*	0	1 (6,3)	32 (11,6)
MccJ25	2 (1,1)	5 (17,9)*	0	0	7 (2,5)
MccV	17 (9,6)	3 (10,7)	4 (7,1)	1 (6,3)	25 (9,0)
MccM	33 (18,6)	1 (3,6)	8 (14,3)	2 (12,5)	44 (15,9)
MccH47	22 (12,4)	0	2 (3,6)	0	24 (8,7)
ColM	8 (4,5)	14 (50,0)*	5 (8,9)	3 (18,8)	30 (10,8)
ColK	3 (1,7)	2 (7,1)	1 (1,8)	0	6 (2,2)
ColB	5 (2,8)	5 (17,9)*	3 (5,4)	1 (6,3)	14 (5,1)
ColE1	14 (7,9)	3 (10,7)	8 (14,3)	1 (6,3)	26 (9,4)
ColIa	18 (10,2)	0	5 (8,9)	2 (12,5)	25 (9,0)
ColIb	6 (3,4)	0	3 (5,4)	4 (25,0)*	13 (4,7)

Примечание. «*» – разница достоверна, *p* < 0,05, точный критерий Фишера с поправкой на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга

Выявлено, что несмотря на общую принадлежность АРЕС и УРЕС к группе ExРЕС, штаммы АРЕС составляли обособленную группу по профилям генов бактериоцинов, тогда как УРЕС были более близки к комменсальным *E. coli* (Рисунок 1Г). Установлено, что штаммы птичьего происхождения (комменсальные и АРЕС) чаще содержали полноценные локусы микроцина V (включая структурный ген *cvaC*, гены белков экспорта *cvaA*, *cvaB* и иммунитета *cvi*), у штаммов УРЕС чаще наблюдалось отсутствие локуса, у комменсальных штаммов обнаруживались неполноценные локусы с генами экспорта, что отражает эволюцию и реорганизацию локуса микроцина V у разных патотипов *E. coli* (Рисунок 1Д).

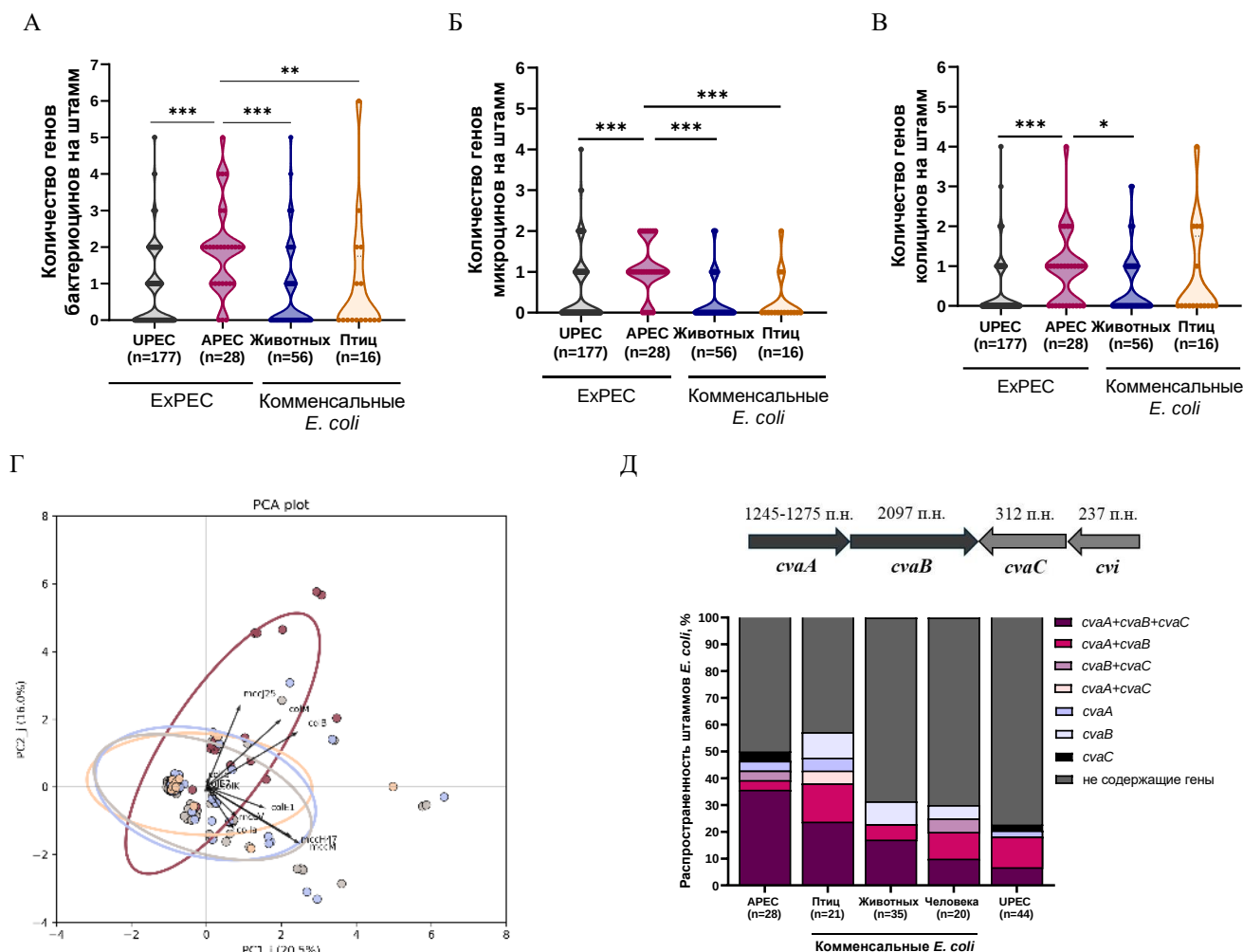


Рисунок 1 – Количество генов биосинтеза бактериоцинов (А), микроцинов (Б) и колицинов (В), детектированных в штаммах *E. coli* различных эколого-патотипических групп. Визуализация различий профилей бактериоцинов АРЕС (красный эллипс), УРЕС (серый эллипс), комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от животных (голубой эллипс) и птиц (желтый эллипс), методом анализа главных компонент (РСА) (Г). Диаграмма, показывающая присутствие комбинаций генов локуса микроцина V в геномах *E. coli* различных групп и структура локуса микроцина V (Д); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, тест Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность.

Разнообразие бактериоцинов уropатогенных *E. coli*, выделенных от пациентов стационаров и поликлиник. Общее количество бактериоцинов значительно не различалось между штаммами *E. coli*, изолированными от пациентов стационаров и поликлиник, однако изоляты, несущие гены 5 бактериоцинов одновременно, были выделены только у пациентов стационаров. Среди поликлинических изолятов чаще детектировали ген микроцина-сидерофора М (OR = 2,3, 95% CI 1,0-5,1, $p = 0,04$, критерий χ^2), чем среди *E. coli*, выделенных от пациентов стационаров (Таблица 3). Обнаружено, что в группе изолятов от пациентов отделений реанимации доминирующим колицином был пороформирующий колицин Ia, в группе изолятов от пациентов хирургических отделений – пороформирующий микроцин V, а в группе изолятов от пациентов терапевтических отделений – колицин М и микроцин-сидерофор М.

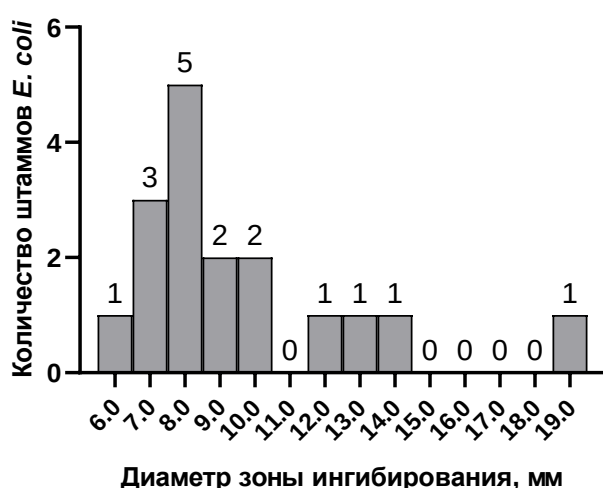
Таблица 3 – Распространенность генов бактериоцинов среди *E. coli*, выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей, проходивших амбулаторное или стационарное лечение

Бактериоцины	UPEC, изолированные от пациентов, n (%)		UPEC, выделенных от пациентов отделений стационара, n (%)			Всего (n=177)
	стационаров (n=88)	поликлиник (n=89)	терапии (n=33)	хирургии (n=34)	реанимации (n=21)	
MccB17	4 (4,5)	6 (6,7)	3 (9,1)	1 (2,9)	0	10 (5,6)
MccJ25	0	2 (2,2)	0	0	0	2 (1,1)
MccV	11 (12,5)	6 (6,7)	1 (3,0)	8 (23,5)	2 (9,5)	17 (9,6)
MccM	11 (12,5)	22 (24,7)*	5 (15,2)	5 (14,7)	1 (4,8)	33 (18,6)
MccH47	9 (10,2)	13 (14,6)	4 (12,1)	4 (11,8)	1 (4,8)	22 (12,4)
ColM	7 (8,0)	1 (1,1)	5 (15,2)	2 (5,9)	0	8 (4,5)
ColK	1 (1,1)	2 (2,2)	0	1 (2,9)	0	3 (1,7)
ColB	5 (5,7)	0	3 (9,1)	2 (5,9)	0	5 (2,8)
ColE1	7 (8,0)	7 (7,9)	3 (9,1)	4 (11,8)	0	14 (7,9)
ColIa	12 (13,6)	6 (6,7)	2 (6,1)	5 (14,7)	5 (23,8)	18 (10,2)
ColIb	3 (3,4)	3 (3,4)	1 (3,0)	2 (5,9)	0	6 (3,4)

Примечание. * $p < 0,05$, критерий χ^2

Разнообразие бактериоцинов комменсальных *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц. Доля штаммов с фенотипом продукции бактериоцинов среди комменсальных *E. coli* составила 23,6%. Диапазон диаметров зон ингибирования составлял: Me[Q1–Q3] = 8,3[7,5–10,0] мм (Рисунок 2А). Все проанализированные штаммы, продуцирующие бактериоцины, содержали гены биосинтеза как минимум одного пороформирующего бактериоцина, а большинство штаммов несли гены бактериоцинов с двумя и более различными механизмами действия (Рисунок 2Б). Наиболее распространенными были гены, кодирующие микроцин М (58,8%), колицины E1 (52,9%), Ia (29,4%), E9, Ib, B (все три были обнаружены у 23,5% штаммов). Гены микроцинов B17, V и колицинов K, E8, U, Y были обнаружены только в одном штамме. Гены микроцинов J25, C7, L и колицинов E2, E4, E5, E6, E7, A, D, S4, Js обнаружены не были (Kuznetsova *et al.*, 2022). Найдены штаммы, которые содержали шесть (*E. coli* C25) и семь (*E. coli* Br1) различных генов бактериоцинов.

А



Б

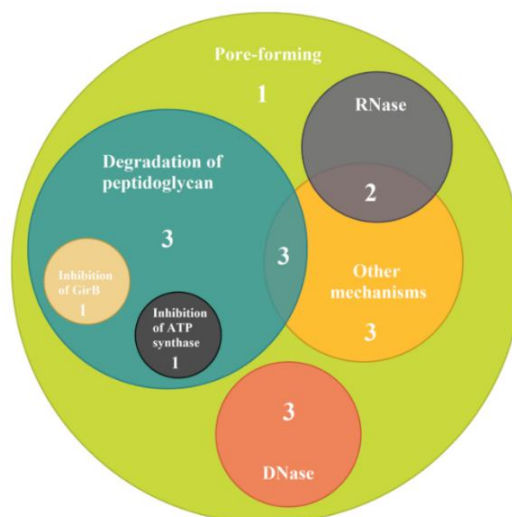


Рисунок 2 – Гистограмма распределения количества штаммов *E. coli* в зависимости от диаметра зоны ингибирования *E. coli* DH5α (А). Диаграмма Вена, отражающая комбинации обнаруженных генов бактериоцинов с различным механизмами действия (число указывает на количество штаммов с соответствующими комбинациями) (Б).

2. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ, ИХ СВЯЗЬ С ПРОДУКЦИЕЙ И ГЕНАМИ БАКТЕРИОЦИНОВ

Распространенность островов патогенности и их ассоциация с бактериоциногенией экстраинтестинальных патогенных и комменсальных *E. coli*. Выявлено, что распространенность маркеров островов патогенности зависела от эколого-патотипической принадлежности штаммов. UPEC характеризовались наибольшей распространенностью маркеров островов патогенности (Рисунок 3А). В группе комменсальных *E. coli* чаще детектировали HPI, тогда как среди АРЕС и UPEC – остров SHI-2 (Рисунок 3Б). У 19,6% штаммов UPEC обнаруживался ген *clbA*, кодирующий генотоксин колибактин, ассоциированный с *pks*-островом. Определено, что бактериоцин-продуцирующие комменсальные *E. coli* чаще содержали в геноме два и более острова патогенности, чем не продуцирующие (23,5% против 1,8%) (Mihailovskaya *et al.*, 2025).

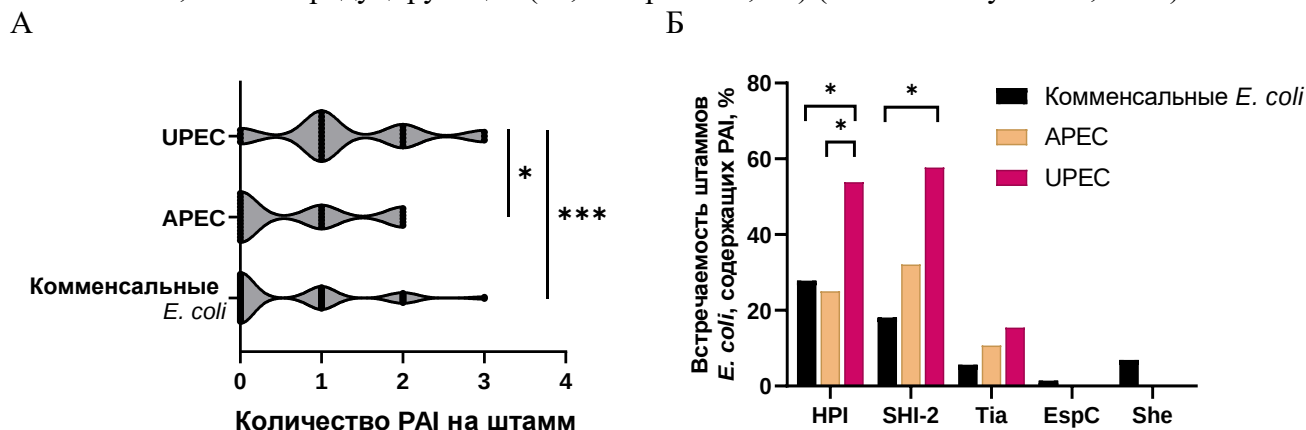


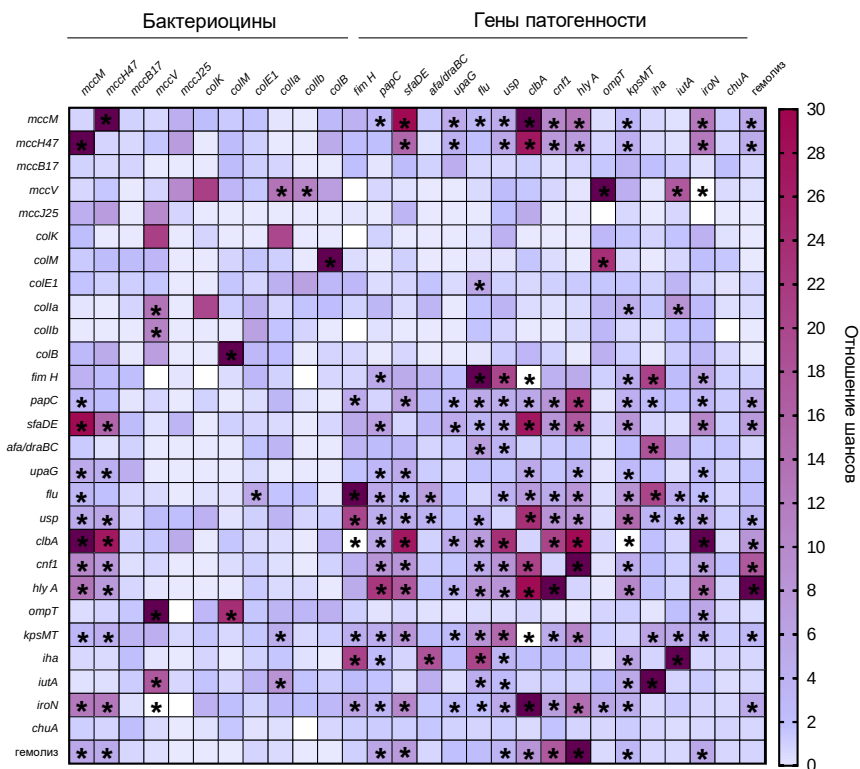
Рисунок 3 – Количество островов патогенности (PAI) в штаммах *E. coli* (А). Встречаемость PAI (Б); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, тест Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна на множественность.

Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с бактериоциногенией патогенных для птиц *E. coli*. Среди штаммов АРЕС доминировали гены патогенности, связанные с защитой от иммунных механизмов хозяина и захватом железа. В этой группе не было выявлено значимых различий в общем количестве генов патогенности между продуцирующими и не продуцирующими бактериоцины штаммами (Me[Q1–Q3] составила 8,0[7,0–9,3] против 9,0[6,8–9,5]; $p > 0,05$; тест Крускала-Уоллеса), а также распространенностью конкретных генов.

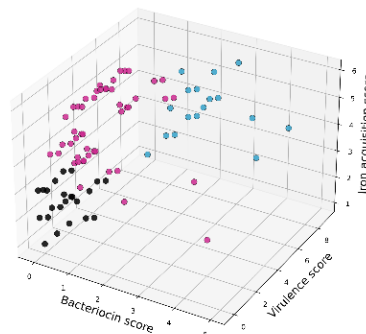
Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с генами биосинтеза бактериоцинов уропатогенных *E. coli*. В группе UPEC изоляты, содержащие гены двух и более бактериоцинов, чаще несли факторы патогенности, чем изоляты, содержащие один или не кодирующие ни одного бактериоцина. Разница была достоверна для следующих генов: *sfaDE*, *flu*, *usp*, *cnf1*, *hlyA*, *clbA*, *ompT*, *iroN* ($p < 0,05$, точный критерий Фишера). Выявлена тесная ассоциация генов биосинтеза бактериоцинов с генами патогенности: микроцинов-сидерофоров М и Н47 с *sfaDE*, *usp*, *clbA*, *cnf1*, *hlyA*, *kpsMTII*, *iroN*, гена микроцина V – с *ompT*, *iutA*, *iroN* (во всех случаях $p_{\text{вн}} < 0,05$, точный критерий Фишера). Выявлено множество значимых ассоциаций между отдельными генами патогенности (Рисунок 4А). Гемолитические UPEC встречались в 2,9 раз чаще среди штаммов, кодирующих два и более бактериоцина.

Было обнаружено 18,1% изолятов с высоким уропатогенным потенциалом (т.е. имеющих индекс патогенности ≥ 3 , индекс железахвата ≥ 4 и индекс бактериоциногенности ≥ 2), 28,8% – с низким, 53,1% были промежуточными (Рисунок 4Б). Сравнение изолятов *E. coli*, выделенных от пациентов стационаров и поликлиник, показало, что изоляты с высоким уропатогенным потенциалом были распределены равномерно, при этом доля *E. coli* со средним и/или высоким потенциалом была выше в отделениях реанимации, чем терапии или хирургии (Рисунок 4В). Важно отметить, что шанс встретить резистентные к цефалоспорином изоляты был выше в группе *E. coli* с низким уропатогенным потенциалом, чем с промежуточным или высоким (OR = 4,0, 95% CI 1,1–15,3).

А



Б



В

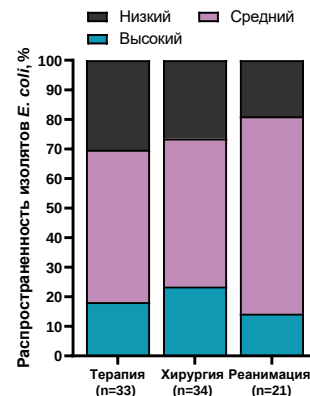


Рисунок 4 – Тепловая карта, отражающая шанс совместной встречаемости генов бактериоцинов и генов патогенности у штаммов UPEC (n=177). Каждая ячейка представляет рассчитанное отношение шансов (А). 3D-плот, отражающий распределение изолятов, где оси x, y, z соответствуют индексам патогенности, бактериоциногенности и железахвата соответственно. Каждая точка эквивалентна изоляту, а цвет точки соответствует низкому (черный), среднему (розовый) или высокому (синий) уропатогенному потенциалу (Б). Распределение изолятов с различным уропатогенным потенциалом в группах пациентов отделений стационаров (терапии, хирургии и реанимации) (В), «*» – разница достоверна, $p_{\text{BH}} < 0,05$, точный критерий Фишера.

Распространенность факторов патогенности и их ассоциация с бактериоциногенностью комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц. Комменсальные штаммы характеризовались меньшим количеством генов патогенности в сравнении с АРЕС и UPEC, однако несли эпидемиологически значимые детерминанты. Большинство проанализированных *E. coli* несли комбинации генов трех патотипов АРЕС, InPEC/DEC, ExPEC одновременно. Более половины штаммов, выделенных от крупного рогатого скота, соответствовали критерию классификации ExPEC согласно Johnson и Russo (2005), поскольку несли два и более из следующих генов: *papC*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *kpsMTII* и *iutA*. Были выявлены культуры (22,5%), которые соответствовали критерию ExPEC и одновременно включали гены, ассоциированные с патотипами InPEC. Обнаружены штаммы, которые несли гены, связанные с ETEC (*estI*, *estII*, *eltA*), четыре культуры содержали гены-маркеры STEC *stx1* (2,0%) и *stx2* (6,1%). Выделен гетеропатогенный штамм, содержащий одновременно гены-маркеры патотипов STEC и ETEC (Михайловская и др., 2022). Анализа данных полногеномного секвенирования показал, что как штаммы АРЕС, так и комменсальные *E. coli* характеризовались высоким разнообразием генов патогенности.

Комменсальные бактериоцин-продуцирующие *E. coli* содержали больше генов патогенности в сравнении со штаммами, не продуцирующими бактериоцины (Me[Q1–Q3] составила 3,0[2,0–6,0] против 2,0[1,0–3,0]; $p < 0,05$; тест Крускала-Уоллеса). В группе бактериоциногенных штаммов чаще встречались следующие гены: *ehxA*, *iss*, *ompT*, *iutA*, *iroN* (Таблица 4). *E. coli* с лизогенным фенотипом чаще обнаруживались среди штаммов-продуцентов бактериоцинов ($p = 0,02$, точный критерий Фишера). Наблюдалась ассоциация микроцина V со следующими генами патогенности: *hlyF*, *ompT*, *iss*, *iroN*. Колицин М часто присутствовал у *iutA*-позитивных штаммов (OR = 16,6), а колицин E1 – у *iss*-позитивных (OR = 16). Данные подчеркивают, что бактериоцины *E. coli* не являются

независимыми факторами вирулентности, а, скорее выступают маркерами определенных клонов с расширенным патогенным потенциалом.

Таблица 4 – Распространенность генов патогенности среди комменсальных штаммов *E. coli*, продуцирующих и не продуцирующих бактериоцины

Ген	Кодируемый фактор	Встречаемость <i>E. coli</i> , позитивных на гены патогенности, n (%)		
		продуцирующие бактериоцины (n=17)	не продуцирующие бактериоцины (n=55)	Всего (n=72)
<i>fimH</i>	фимбрии 1 типа	16 (94,1)	48 (87,3)	64 (88,8)
<i>cnfI</i>	цитотоксический некротический фактор	0	0	0
<i>hlyA</i>	гемолизин А	2 (11,8)	7 (12,7)	9 (12,5)
<i>hlyF</i>	гемолизин F	7 (41,2)	13 (23,6)	20 (27,8)
<i>ehxA</i>	энтерогемолизин	5 (29,4)*	4 (7,3)	9 (12,5)
<i>stx1</i>	шига-подобный токсин 1 типа	0	1 (1,8)	1 (1,4)
<i>stx2</i>	шига-подобный токсин 2 типа	2 (11,8)	3 (5,5)	5 (6,9)
<i>eastI</i>	энтероаггративный термостабильный энтеротоксин	5 (29,4)	12 (21,8)	17 (23,6)
<i>estI</i>	термостабильный энтеротоксин а	2 (11,8)	3 (5,5)	5 (6,9)
<i>estII</i>	термостабильный энтеротоксин b	0	0	0
<i>eltA</i>	термолабильный энтеротоксин	1 (5,9)	6 (10,9)	7 (9,7)
<i>ompT</i>	протеаза наружной мембраны	7 (41,2)*	9 (16,4)	16 (22,2)
<i>kpsMTII</i>	капсульный антиген II группы	2 (11,8)	9 (16,4)	11 (15,3)
<i>iss</i>	белок резистентности к сыворотке	4 (23,5)*	3 (5,5)	7 (9,7)
<i>iha</i>	бифункциональный адгезин-рецептор энтеробактина	0	0	0
<i>iutA</i>	рецептор аэробактина	11 (64,7)*	15 (23,7)	26 (36,1)
<i>iroN</i>	рецептор сальмокселина	8 (47,1)*	8 (14,5)	16 (22,2)
<i>chuA</i>	рецептор к гемю	13 (76,5)	31 (56,4)	44 (61,1)
Количество генов патогенности, Me[Q1–Q3]		3,0[2,0–6,0]	2,0[1,0–3,0]	–

Примечание. «*» – разница статистически достоверна, $p < 0,05$, точный критерий Фишера

Распространенность антибиотикорезистентности, генов устойчивости и мобильных генетических элементов у комменсальных и патогенных для птиц штаммов *E. coli*, а также их связь с бактериоциногенностью. Высокий уровень резистентности комменсальных штаммов был выявлен к ампициллину (59,7%) и тетрациклину (48,6%), в то время как устойчивость к фторхинолонам и аминогликозидам не превышала 10%. У 26,4% штаммов был обнаружен фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Из них 3 штамма были устойчивы одновременно к 8 протестированным антибиотикам. В геномах комменсальных *E. coli*, выделенных от сельскохозяйственных животных, было обнаружено от 0 до 5 генов устойчивости к антибиотикам. Распространенность *bla*_{TEM} была самой высокой (59,7% от всех штаммов), затем следовали *tetA*, *bla*_{CTX-M}, *catA1*, встречаемость других генов составила менее 5%. Стоит отметить, что 94,4% штаммов с МЛУ содержали комбинацию генов устойчивости к β-лактамам антибиотикам и не-β-лактамам одновременно. Была обнаружена взаимосвязь между *qnrB* и *bla*_{CTX-M} ($rs = 0,37$), *tetA* ($rs = 0,31$), *qnrS* ($rs = 0,39$), а также *floR* с *bla*_{CTX-M} ($rs = 0,39$), *tetA* ($rs = 0,31$), *cmlA* ($rs = 0,30$). В то же время, *cmlA* часто встречался совместно с *bla*_{SHV} ($rs = 0,30$) и *catA1* ($rs = 0,40$). Штаммы с фенотипом МЛУ чаще содержали интегроны (31,6% против 5,7%, $p = 0,007$, точный критерий Фишера), бактериофаги (57,9% против 26,4%, $p = 0,015$) и конъюгативные F-подобные плазмиды (73,7% против 49,1%, $p = 0,059$), чем штаммы без фенотипа МЛУ (Mihailovskaya *et al.*, 2024; Kuznetsova *et*

al., 2025). Результаты анализа данных полногеномного секвенирования показали, что штаммы содержали от 2 до 16 генов устойчивости к антибиотикам (Sutormin *et al.*, 2023).

Фенотип устойчивости к цефалоспорином (цефоперазону, цефепиму) и азтреонаму был тесно ассоциирован с бактериоцин-продуцирующими штаммами АРЕС и комменсальными *E. coli*. Шанс детектировать гены *bla*_{CTX-M} (OR = 7,2; $p = 0,02$), *tetA* (OR = 3,6; $p = 0,03$), *qnrB* и *floR* (OR = 7,2; $p > 0,05$) в группе бактериоцин-продуцирующих комменсальных *E. coli* был выше, чем среди не продуцирующих бактериоцины штаммов (Таблица 5). Важно отметить, что как в группе АРЕС, так и в группе комменсальных *E. coli*, бактериоцин-продуцирующие штаммы чаще содержали маркер конъюгативной плазмиды *traJ*. Обнаружены значимые ассоциации между присутствием гена *bla*_{CTX-M} и гена биосинтеза микроцина М (OR = 19,7; $p_{\text{BH}} = 0,04$) и колицина E1 (OR = 25; $p_{\text{BH}} < 0,001$) среди комменсальных *E. coli*. В группе АРЕС статистически значимых ассоциаций не было обнаружено. Ярким примером накопления генов устойчивости к антибиотикам и локусов бактериоцинов в составе мобильных генетических элементов (плазмид) служит геном секвенированного штамма *E. coli* C51, который содержал 6 кластеров бактериоцинов, из них 5 располагались на плазмидах: микроцин V и колицин Ia (на плазмиде pC5101), колицин D (pC5105), колицин E9 (pC5106), колицин 10 (pC5108), а также микроцин М (на хромосоме).

Таблица 5 – Распространенность устойчивости к антибиотикам среди комменсальных штаммов *E. coli*, выделенных от здоровых животных и птиц

Антибиотик/ген	Распространенность <i>E. coli</i> , устойчивых к антибиотикам, n (%)			
	АРЕС (n=28)		Комменсальные <i>E. coli</i>	
	продуцирующие бактериоцины (n=20)	не продуцирующие бактериоцины (n=8)	продуцирующие бактериоцины (n=17)	не продуцирующие бактериоцины (n=55)
Ампициллин	16 (80)	6 (75)	12 (70,6)	31 (56,4)
Тетрациклин	15 (75)	7 (87,5)	11 (64,7)	24 (43,6)
Хлорамфеникол	6 (30)	5 (62,5)	4 (23,5)	8 (14,5)
Цефоперазон	5 (25)*	0	5 (29,4)*	5 (9,1)
Цефепим	5 (25)*	0	5 (29,4)*	4 (7,3)
Азтреонам	5 (25)*	0	5 (29,4)*	4 (7,3)
Ципрофлоксацин	7 (35)	3 (37,5)	1 (5,9)	5 (9,1)
Левифлоксацин	4 (20)	2 (25)	0	5 (9,1)
Амикацин	2 (10)	0	0	2 (3,6)
Гентамицин	10 (50)	2 (25)	1 (5,9)	1 (1,8)
Меропенем	0	0	0	0
<i>bla</i> _{TEM}	15 (75)	5 (62,5)	12 (70,6)	31 (56,4)
<i>tetA</i>	5 (25)	3 (37,5)	9 (52,9)*	13 (23,6)
<i>bla</i> _{CTX-M}	11 (55)	4 (50)	5 (29,4)*	3 (5,5)
<i>bla</i> _{SHV}	0	1 (12,5)	0	3 (5,5)
<i>qnrB</i>	5 (25)	1 (12,5)	2 (11,8)	1 (1,8)
<i>qnrS</i>	1 (5)	0	1 (5,9)	1 (1,8)
<i>aacC2</i>	7 (35)	1 (12,5)	0	0

Примечание. Статистический анализ проведен с помощью точного критерия Фишера, «*» – разница статистически достоверна, $p < 0,05$.

3. БАКТЕРИОЦИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ КОММЕНСАЛЬНЫЕ *E. COLI*: АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, СПОСОБНОСТЬ К АДГЕЗИИ *IN VITRO* И ЭФФЕКТ *IN VIVO*

Антагонистическая активность бесклеточных культуральных жидкостей бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli* в отношении условно-патогенных тест-штаммов *in vitro*. Все бесклеточные культуральные жидкости бактериоцин-продуцирующих комменсальных *E. coli* демонстрировали антагонистическую активность в отношении АРЕС и InРЕС (в том числе – устойчивых к антибиотикам), однако эффективность ингибирования варьировала и зависела от тест-штамма (Kuznetsova *et al.*, 2022). При этом уровень ингибирования роста АРЕС в среднем был выше, чем InРЕС, что отражает различия в профилях генов бактериоцинов и, соответственно, систем иммунитета к ним (Таблица 6).

Таблица 6 – Ингибирование роста тест-штаммов *E. coli* после 22 часов инкубации с бесклеточными культуральными жидкостями бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli*, %

Штамм-продуцент	Индекс ингибирования роста тест-штаммов, %					
	АРЕС			InРЕС		
	BR4	BR35	BR37	CA29	CA43	CA46
Ch1	31,5±15,8	46,1±9,0*	37,2±6,0	17,2±0,4	19,8±6,6	20,8±6,7
Q5	38,3±11,0	49,9±7,3*	41,3±8,3*	22,8±4,5	29,9±3,2	31,0±3,7
Q8	47,1±8,8*	55,0±7,8*	47,6±3,6*	20,0±5,9	23,4±4,7	24,1±4,2
Q12	28,4±6,3	38,9±3,8	42,7±5,1*	24,8±3,2	17,0±6,0	17,0±5,3
C18	41,3±11,8*	44,8±3,1*	35,5±9,3	22,7±1,5	11,4±2,1	12,7±1,4
C19	30,6±7,5	44,2±3,9*	31,5±5,7	24,1±3,1	14,8±3,0	15,7±1,6
C23	58,6±11,5*	51,7±11,2*	43,8±3,9*	10,4±1,7	2,7±2,7	3,6±2,3
C25	34,4±7,5	35,6±4,1	36,9±5,6	7,8±2,9	6,3±2,6	7,1±1,2
C32	42,8±10,4*	51,6±1,9*	42,1±4,6*	20,2±2,6	33,9±7,8	32,5±8,6
C40	45,4±5,7*	51,8±3,5*	40,0±4,2*	19,8±0,7	11,8±4,6	12,3±4,7
C41	46,9±17,6*	58,6±6,9*	43,2±6,9*	24,3±5,9	38,5±5,7	36,8±5,9
C45	27,6±3,7	34,6±2,9	38,2±2,8	15,4±1,7	3,6±3,1	4,5±3,4
C48	14,8±16,0	31,0±6,0	42,3±5,3*	17,4±2,6	1,4±2,4	3,0±2,6
C49	40,9±12,2*	47,4±3,6*	34,3±6,0	16,6±2,4	0	0
C51	33,7±10,6	41,1±3,8*	34,8±5,1	18,5±3,1	7,4±6,6	7,8±6,1
C56	42,4±4,9*	48,8±4,1*	38,1±2,7	25,7±4,0	21,2±3,5	21,4±3,2
C61	19,1±2,6	38,3±3,2	31,9±6,9	36,6±7,6	42,0±3,6*	42,1±6,4*

Примечание. *E. coli* BR4: TET^R; *E. coli* BR35: AMP^R, CPF^R, LEV^R, GEN^R, TET^R; *E. coli* BR37: AMP^R, CPF^R, CFO^R, CFT^R, AMK^R, GEN^R, TET^R; *E. coli* CA29: чувствительный к антибиотикам; *E. coli* CA43: AMP^R, CPF^R, CFO^R, CFR^R, AZT^R; *E. coli* CA46: AMP^R, CPF^R, CFR^R, AZT^R, TET^R.

Характеристика профилей биобезопасности бактериоцин-продуцирующих штаммов *E. coli*. Скрининг показал, что два штамма (*E. coli* Q5 и *E. coli* C41) не содержали генов, связанных с вирулентностью, были чувствительны к антибиотикам, не были лизогенными или гемолитическими и, следовательно, могут быть перспективными кандидатами для биотехнологического применения. Эти штаммы относились к серотипам O8:H10 и O149:H2 и принадлежали к сиквенс-типам ST1257 и ST388 соответственно.

Анализ геномов штамм *E. coli* Q5 и *E. coli* C41. Полный геном штамма *E. coli* Q5 состоял из хромосомы и 5 плазмид, *E. coli* C41 содержал 2 плазмиды (Рисунок 5). На мобильных генетических элементах секвенированных штаммов не было обнаружено генов устойчивости к антибиотикам, также не выявлено мутаций в локусах *gyrA/parC/parE*. В геноме *E. coli* Q5 не было обнаружено генов энтеротоксинов, цитотоксинов, гемолизина, однако штамм *E. coli* C41 нес хромосомный кластер генов *cdtABC*. Геном *E. coli* Q5 содержал три полных набора функциональных генов, необходимых для производства, экспорта и иммунитета к колицинам Ia и Ib (оба на плазмиде

pQ501), и колицина Y (на плазмиде pQ504). Плазмида *E. coli* C41 pC4102 содержала полный набор функциональных генов продукции и экспорта порообразующего колицина E1 (*cea*, *cei*, *cel*) (Mihailovskaya *et al.*, 2023).

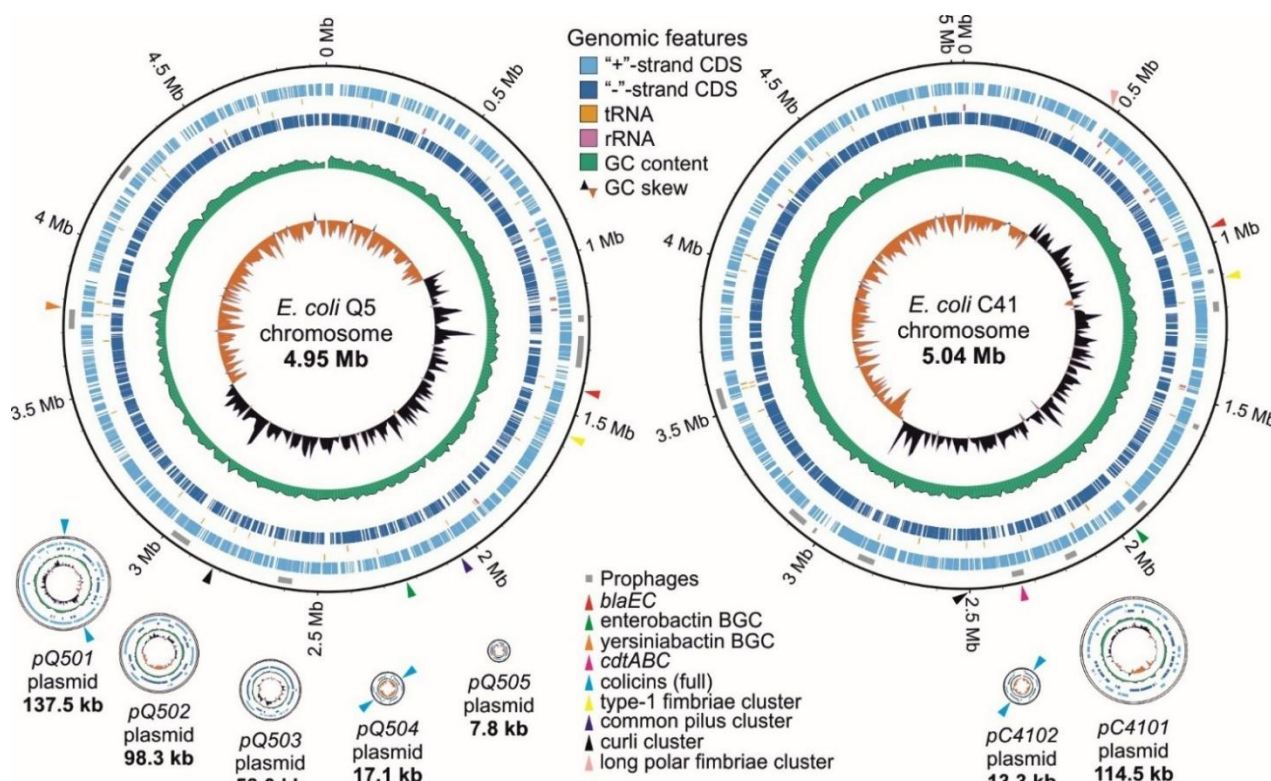


Рисунок 5 – Организация геномов штаммов *E. coli* Q5 и C41, визуализированная с использованием программы GenoVi (<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010998>).

Оценка антагонистической активности бесклеточных культуральных жидкостей *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 в отношении условно-патогенных тест-штаммов *in vitro*. Бесклеточные культуральные жидкости штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 оказывали бактериостатическое действие на патогенные для птиц *E. coli* (BR4, BR35, BR37), диареогенные *E. coli* (CA29, CA43, CA46, O157), *K. pneumoniae*, в меньшей степени – на *S. flexneri* и *S. aureus*. Индекс ингибирования роста был максимальным после 22 часов совместного культивирования в большинстве случаев, однако снижение скорости роста наблюдалось уже после 6 часов инкубации. Экзометаболиты *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 ингибировали рост *E. coli* BR35 ($p = 0,03$ и $p = 0,02$ соответственно, t-критерий Стьюдента), *E. coli* CA46 ($p = 0,02$), а также *K. pneumoniae* и *S. flexneri* ($p < 0,05$) более эффективно, чем *E. coli* M-17. Комбинирование бесклеточных культуральных жидкостей не привело к значительному увеличению антагонистического эффекта.

Оценка взаимодействия штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 с представителями *Lactobacillus* spp. *in vitro*. Наиболее чувствительным к действию лактобактерий был штамм *E. coli* Q5, тогда как штамм *E. coli* C41 характеризовался меньшей чувствительностью. Комбинирование *L. acidophilus* КЗШ24 и *E. coli* C41 в соотношении 1:1 по биомассе приводило к увеличению выживаемости *E. coli* C41 в модельной среде желудка и усиливало подавление роста ряда условно-патогенных микроорганизмов, включая *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. mirabilis* и *E. faecalis*.

Оценка свойств клеточной поверхности и способности к адгезии *in vitro* штаммов *E. coli* Q5 и *E. coli* C41. Штамм *E. coli* Q5 характеризовался меньшей гидрофобностью клеточной поверхности, а *E. coli* C41, выращенный на богатой среде LB, был сопоставим по этому показателю с коммерческим пробиотическим штаммом *E. coli* M-17 (Рисунок 6А, Б). *E. coli* C41 имел сравнимый с *E. coli* M-17 уровень неспецифической адгезии к гидрофобной поверхности, однако индекс адгезии к гидрофильной поверхности был значимо выше, чем у *E. coli* M-17 ($p < 0,01$) (Рисунок 6В, Г). Различия в уровне адгезии обусловлены специфическими профилями генов адгезии штаммов (Рисунок 6Д) (Mihailovskaya *et al.*, 2023).

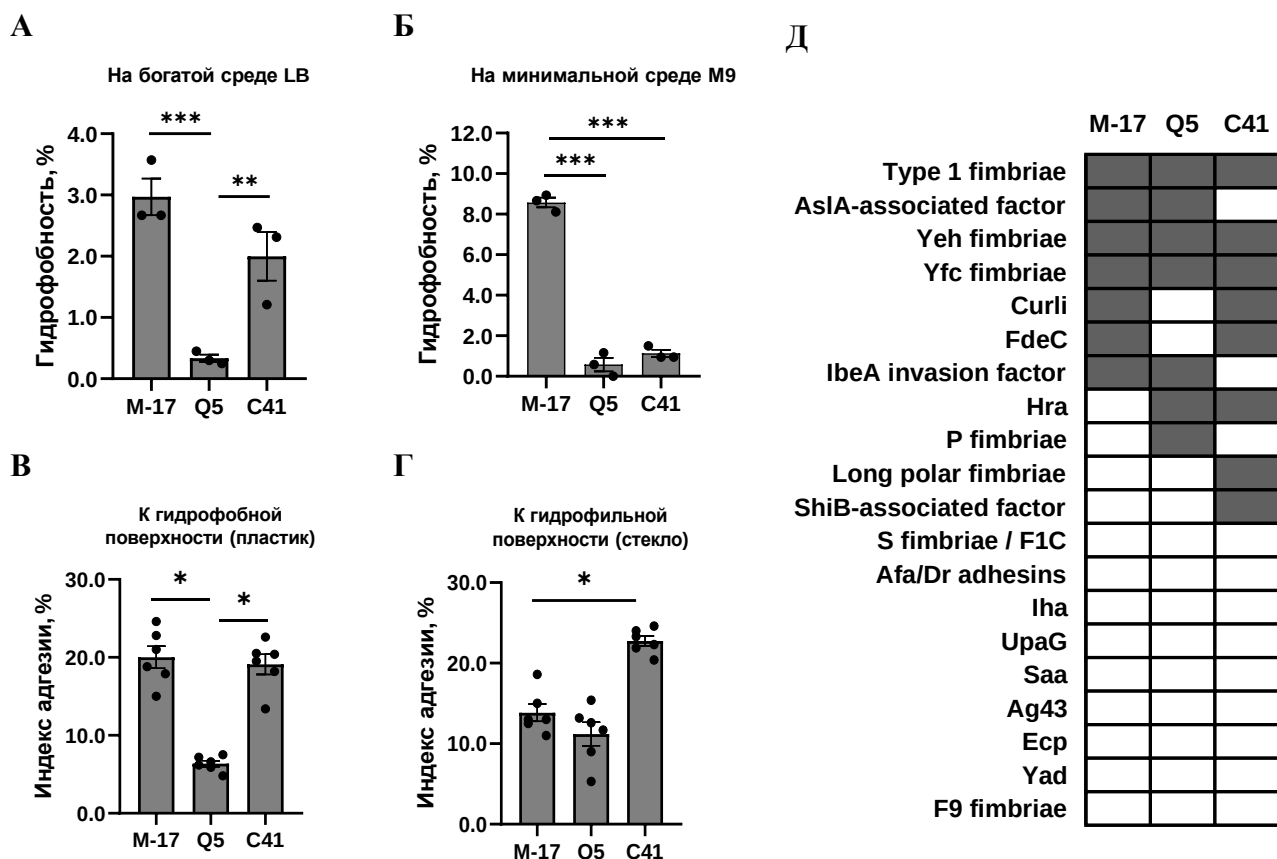


Рисунок 6 – Гидрофобность клеток *E. coli* Q5, C41 и M-17, выращенных на богатой питательной среде LB (А) или минимальной питательной среде M9 (Б). Индекс адгезии штаммов *E. coli* Q5, C41 и M-17 к гидрофобной поверхности (В) и к гидрофильной поверхности (Г). Гены адгезинов, обнаруженные в геномах штаммов *E. coli* (Д), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Оценка **специфической адгезии** показала, что *E. coli* Q5 обладал низкой адгезивностью к человеческим эритроцитам, но наибольшим уровнем адгезии к эритроцитам коров. *E. coli* C41 был отнесен к группе среднеадгезивных и имел сопоставимые индексы адгезивности как к эритроцитам коров, так и к эритроцитам человека (Таблица 7). Стоит отметить, что оба штамма имели большее сродство к эритроцитам коров, в отличие от *E. coli* M-17, что, вероятно, связано с происхождением *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 и может позволить более эффективно колонизировать кишечник животных.

Таблица 7 – Специфическая адгезия пробиотических штаммов *E. coli* к эритроцитам

Уровень адгезии	<i>E. coli</i> M-17	<i>E. coli</i> Q5	<i>E. coli</i> C41
к эритроцитам человека			
AAI	1,60±0,04	0,83±0,12	1,21±0,04
AC	0,58±0,06	0,47±0,07	0,48±0,00
IAM	2,80±0,36	1,78±0,09*	2,53±0,09
характеристика	среднеадгезивный	низкоадгезивный	среднеадгезивный
к эритроцитам коровы			
AAI	1,35±0,17	2,08±0,18	1,65±0,08
AC	0,59±0,07	0,76±0,02	0,65±0,05
IAM	2,30±0,03	2,73±0,16	2,56±0,05
характеристика	низкоадгезивный	среднеадгезивный	среднеадгезивный

Примечание. «*» – разница достоверна по отношению к штамму *E. coli* M-17, * $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента.

Влияние *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 на биохимические, гематологические, гистологические параметры и состав микробиоты крыс в норме и в модели инфекции. Предварительное введение исследуемых штаммов в течение 5 дней в дозе 5×10^8 КОЕ/голову/день предотвращало

повышение концентрации щелочной фосфатазы и креатинина в крови крыс по сравнению с инфекционным контролем (Рисунок 7Б) (Mihailovskaya *et al.*, 2023). Наблюдалось снижение уровня аланинаминотрансферазы после введения *E. coli* C41, однако показатель был в пределах нормы (Рисунок 7В). Концентрация глюкозы, общего белка и мочевины соответствовала норме. Введение *E. coli* Q5 и C41 сопровождалось увеличением доли моноцитов в крови в сравнении с интактным контролем ($p < 0,05$), что отражало активацию врожденного звена иммунной системы (Рисунок 7Г). Наблюдалось увеличение доли нейтрофилов в среднем в 1,5 раза после заражения *E. coli* C55, а также введения *E. coli* Q5. Количество эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, концентрация гемоглобина, корпускулярного гемоглобина, гематокрит были в пределах нормы. Заражение крыс *E. coli* C55 привело к гистопатологическим изменениям в органах (дистрофии гепатоцитов, отеку стромы, десквамации эпителия кишечника), тогда как введение *E. coli* Q5 и C41 предотвращало эти изменения. Применение *E. coli* Q5 и C41 не нарушало структуру основных представителей кишечной микробиоты, в том числе *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp., сопровождалось увеличением количества типичной *E. coli* (Рисунок 7Д, Е). Выявлено, что введение *E. coli* Q5 и C41 до экспериментальной инфекции способствовало снижению количества гемолитических *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus* spp. в кишечнике крыс (Рисунок 7Ж).

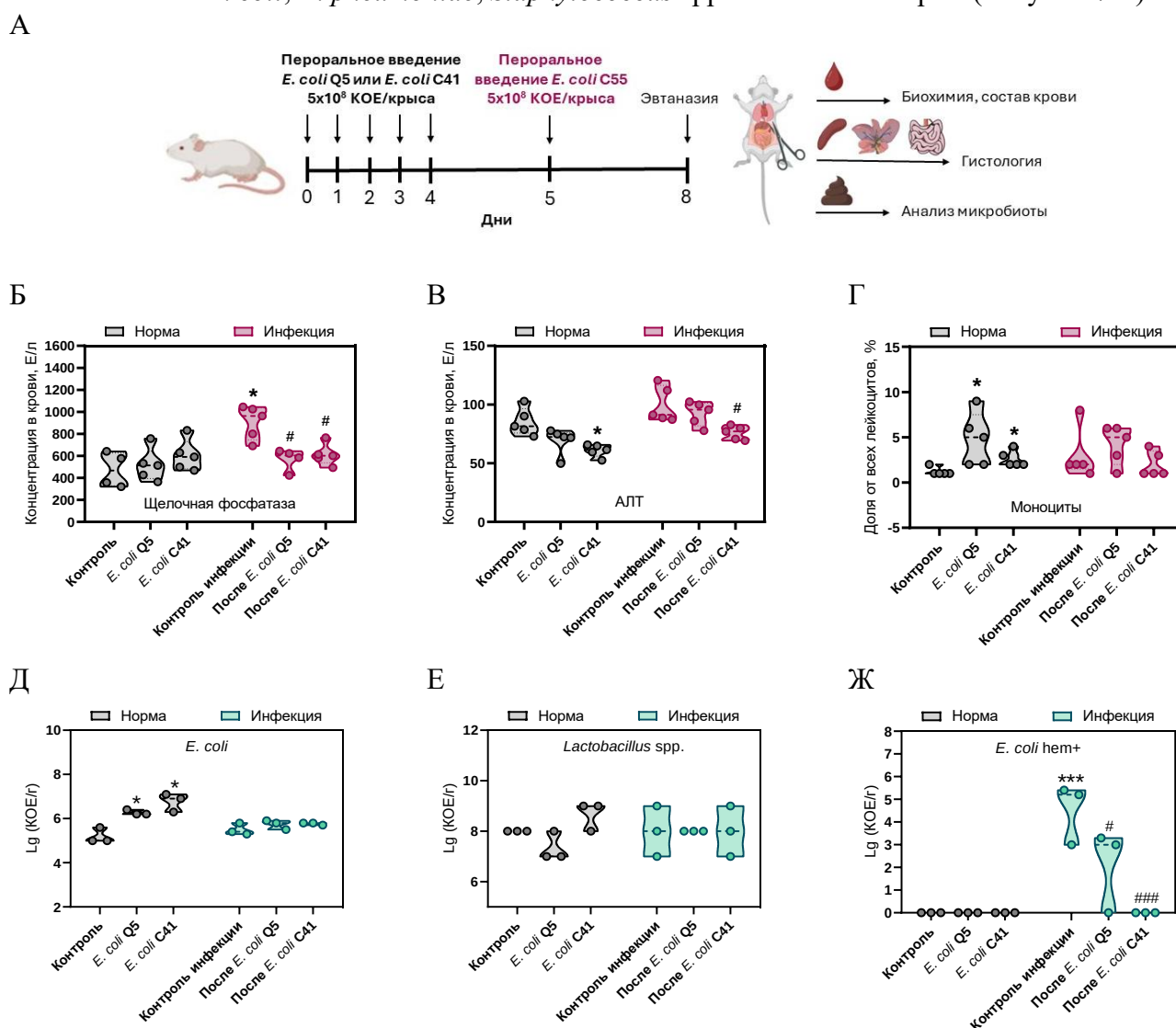


Рисунок 7 – Схема эксперимента *in vivo* (А). Концентрация щелочной фосфатазы (Б), аланинаминотрансферазы (В), количество моноцитов (Г) в крови крыс. Количественное содержание представителей кишечной микробиоты крыс (Д-Ж), «*» или «#» – разница достоверна в сравнении с интактным контролем или контролем инфекции соответственно, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, тест Крускала-Уоллеса с поправкой Дюна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рост устойчивости к антибиотикам среди представителей *Enterobacterales* и дефицит новых антибактериальных препаратов являются глобальной проблемой современности. Бактериоцины рассматриваются как возможная альтернатива или дополнение к традиционной антимикробной терапии, а штаммы-продуценты бактериоцинов – как перспективные для разработки пробиотиков. В настоящей работе проведено комплексное исследование молекулярно-генетического разнообразия бактериоцин-продуцирующих *E. coli* различных эколого-патотипических групп. Показано, что бактериоциногенность может одновременно выступать фактором конкурентоспособности, высокой антагонистической активности и потенциальным маркером сложного адаптивного генотипа, включающего признаки, ассоциированные с патогенностью.

В результате исследований выявлено, что профили бактериоцинов UPEC были ближе к комменсальным *E. coli*, чем к APES, хотя оба патотипа относятся к группе ExPEC, что, вероятно, связано с адаптацией штаммов к разным хозяевам и экологическим нишам. Сходство профилей UPEC и комменсальных *E. coli* можно объяснить их тесной экологической связью, поскольку кишечник является основным резервуаром UPEC. Настоящая работа продемонстрировала, что UPEC характеризуются доминированием генов микроцинов-сидерофоров M и H47. Наличие таких систем может одновременно обеспечивать конкурентное преимущество и захват железа в условиях мочевыводящих путей и воспаления, где доступность железа ограничена. Показано, что среди комменсальных штаммов встречаются носители множества генов бактериоцинов с различными механизмами, что может повышать конкурентоспособность микроорганизма.

Обнаружено, что связь бактериоциногенности с факторами патогенности зависит от патотипа. UPEC и комменсальные штаммы-продуценты бактериоцинов характеризовались большим числом и распространенностью генов патогенности, чем не продуцирующие бактериоцины штаммы. У APES такой закономерности не выявлено, что может быть ассоциировано с высокой распространенностью ColV- и ColBM-ассоциированных плазмид, несущих одновременно детерминанты бактериоцинов и вирулентности. В настоящем исследовании показано, что бактериоциногенность связана с наличием *traJ* – маркера конъюгативных плазмид, и рядом генов устойчивости к антибиотикам, что подтверждает представления о генетической организации колицинов.

Бактериоцин-продуцирующие комменсальные *E. coli* представляют интерес как потенциальные пробиотические микроорганизмы благодаря способности одновременно ограничивать рост и колонизацию близкородственных патогенов, влиять на структуру кишечного микробного сообщества и взаимодействовать с эпителиальными и иммунными клетками хозяина (Sassone-Corsi *et al.*, 2016; Sonnenborn, 2016; Ma *et al.*, 2023; Mihailovskaya *et al.*, 2023). В настоящем исследовании было показано, что предварительное введение штаммов *E. coli* Q5 и C41 в течение 5 дней в дозе 5×10^8 КОЕ/голову защищало крыс от колонизации и патогенного воздействия *E. coli* C55 (*stx1*, *east1*, *ehxA*, *hem*⁺, *Amp*^R). Эти результаты указывают на протективное действие штаммов, причем у штамма *E. coli* C41 данный эффект был более выраженным. По-видимому, это обусловлено не только высокой антагонистической активностью за счет продукции бактериоцинов, но и более высокой колонизационной способностью в сравнении с *E. coli* Q5, а также других механизмов, в том числе антигенной структуры *E. coli* C41 (O149:H2), имитирующей энтеропатогенные варианты, однако точный механизм требует дальнейших исследований.

Перспективы разработки темы связаны с изучением способности исследованных штаммов модулировать иммунный ответ, микробиоту и барьерную функцию кишечника в условиях нормы и воспаления. Полученные данные формируют основу для биотехнологической разработки новых ветеринарных и, в перспективе, медицинских пробиотических препаратов на основе бактериоцин-продуцирующих бактерий, а также расширяют понимание роли бактериоцинов как факторов конкурентоспособности и патогенности.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что профили генов бактериоцинов *E. coli* зависели от эколого-патотипической принадлежности штаммов. АРЕС чаще были позитивны по фенотипу продукции, имели наибольшее количество генов бактериоцинов среди всех групп с доминированием МссВ17, ColM, ColB. UPEC характеризовались доминированием микроцинов-сидерофоров МссМ и МссН47. Комменсальные штаммы отличались доминированием пороформирующих бактериоцинов ColE1, ColB, ColIa, ColIb, МссV.

2. Выявлено, что изоляты UPEC с несколькими бактериоцинами в геноме, а также бактериоцин-продуцирующие комменсальные штаммы *E. coli* имели более выраженные профили патогенности. В группе АРЕС бактериоциногенность не была связана с более высокой частотой встречаемости детерминант патогенности.

3. Обнаружено, что бактериоцин-продуцирующие АРЕС и комменсальные *E. coli* чаще имели фенотип множественной устойчивости к антибиотикам и несли ген-маркер конъюгативных плазмид *traJ*.

4. Выделены и детально охарактеризованы два биотехнологически перспективных штамма *E. coli* Q5 и *E. coli* C41. Показано, что их бесклеточные культуральные жидкости ингибировали рост условно патогенных штаммов эффективнее, чем *E. coli* M-17; бактерии обладали большим сродством к эритроцитам животных, чем к эритроцитам человека; обладали совместимостью с представителями комменсальной микробиоты (*Lactobacillus* spp.) и приемлемыми профилями безопасности *in silico*.

5. Установлено, что предварительное пероральное введение *E. coli* Q5 и *E. coli* C41 крысам до экспериментальной инфекции приводило: к нормализации концентрации щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы и креатинина в крови; снижению выраженности гистопатологических изменений печени и кишечника; а также способствовало снижению количества гемолитических *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus* spp. в кишечнике крыс.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз:

1. Kuznetsova, M.V. Bacteriocin-producing *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract of farm animals: prevalence, molecular characterization and potential for application / M.V. Kuznetsova, **V.S. Mihailovskaya**, N.B. Remezovskaya, M. Starčič Erjavec // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10, No. 8. – Article 1558 (WoS, Scopus, **Q1**, IF 4,7, Белый список, уровень 2).

2. **Михайловская, В.С.** Патогенный потенциал интестинальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от здоровых коров и телят в хозяйствах Пермского края / В.С. Михайловская, Н.Б. Ремезовская, И.Н. Жданова, M. Starčič Erjavec, М.В. Кузнецова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26, № 5. – С. 486–494 (WoS, Scopus, **Q2**, IF 0,98, Белый список, уровень 1).

3. **Mihailovskaya, V.S.** Bacteriocin-producing *Escherichia coli* Q5 and C41 with potential probiotic properties: *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies / V.S. Mihailovskaya, D.A. Sutormin, M.O. Karipova, A.B. Trofimova, V.A. Mamontov, K. Severinov, M.V. Kuznetsova // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – Article 12636 (WoS, Scopus, **Q1**, IF 5,6, Белый список, уровень 1).

4. Sutormin, D.A. Complete genome sequences of three commensal and two avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from farm animals in Russia / D.A. Sutormin, **V.S. Mihailovskaya**, A.B. Trofimova, V.A. Mamontov, M.V. Kuznetsova, K. Severinov // Microbiology Resource Announcements. – 2023. – Article e0065423 (WoS, Scopus, **Q3**, IF 0,6, Белый список, уровень 3).

5. **Mihailovskaya, V.S.** *Escherichia coli* from healthy farm animals: antimicrobial resistance, resistance genes and mobile genetic elements / V.S. Mihailovskaya, M. Starčič Erjavec, M.V. Kuznetsova // Acta Veterinaria Hungarica. – 2024. – Vol. 72, No. 4. – P. 225–234 (WoS, Scopus, **Q3**, IF 1,0, Белый список, уровень 3).

6. **Mihailovskaya, V.S.** Prevalence of pathogenicity island markers among commensal, avian pathogenic, and uropathogenic *Escherichia coli* strains / V.S. Mihailovskaya, P.A. Selivanova, Kuznetsova

M.V. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2025. – Vol. 179, No. 3. – P. 336–341 (WoS, Scopus, **Q3**, IF 0,7, Белый список, уровень 1).

7. Kuznetsova, M.V. Antibiotic resistance and zoonotic potential of *Escherichia coli* strains isolated from birds in the poultry agro-industrial complex / M.V. Kuznetsova, Y.S. Pospelova, **V.S. Mihailovskaya**, D.A. Kochergina // Russian Agricultural Sciences. – 2025. – Vol. 51. – P. 570–580 (РИНЦ, IF 0,45, Белый список, уровень 1).

8. Kuznetsova, M.V. Siderophore production, diversity of siderophore receptors and associations with virulence-associated genes, phylogroups and bacteriocin production in *Escherichia coli* strains isolated from humans, animals and organic fertilizers / M.V. Kuznetsova, **V.S. Mihailovskaya**, P.A. Selivanova, D.A. Kochergina, N.B. Remezovskaya, M. Starčić Erjavec // Microbiology Research. – 2025. – Vol. 16, No. 2. – Article 50 (WoS, Scopus, **Q3**, IF 2,5, Белый список, уровень 3).

Публикации в других журналах и сборниках:

1. **Mihailovskaya, V.S.** Association of bacteriocin and virulence-associated genes with bacteriocin production among faecal *Escherichia coli* strains from healthy farm animals / V.S. Mihailovskaya, M.V. Kuznetsova, M. Starčić Erjavec // GENETIKA. Abstract book. – Slovenia, 2022. – P. 36.

2. Starčić Erjavec, M. The Zoonotic potential of *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Russia and Slovenia / M. Starčić Erjavec, **V.S. Mihailovskaya**, O.A. Artamonova, M.V. Kuznetsova // FEMS Conference on Microbiology. Abstract book. – Serbia, 2022. – P. 1472.

3. **Михайловская, В.С.** Мониторинг шига-токсинпродуцирующих штаммов *Escherichia coli* в популяции здоровых животных / В.С. Михайловская, О.А. Артамонова, М.В. Кузнецова // «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования». Сборник статей всероссийской научной конференции с международным участием. – Пермь: ПГНИУ, 2021. – С. 72-74 (РИНЦ).

4. Starčić Erjavec, M. Antibiotic resistance genes among *Escherichia coli* isolated from fecal samples of healthy farm animals / M. Starčić Erjavec, **V.S. Mihailovskaya**, M.V. Kuznetsova // 10th Congress of European Microbiologists. Abstract book. – Germany, 2023. – P. 914.

5. **Михайловская, В.С.** Мультирезистентные штаммы *Escherichia coli*, изолированные от сельскохозяйственных животных: распространенность и механизмы устойчивости / В.С. Михайловская, М.В. Кузнецова // Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием "БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА". – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – С. 169 (РИНЦ).

6. **Михайловская, В.С.** Сельскохозяйственные животные – источник мультирезистентных штаммов *Escherichia coli* с высоким трансмиссивным потенциалом / В.С. Михайловская, М. Starčić Erjavec, М.В. Кузнецова // Материалы IV Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» и III Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания». – Иркутск: Издательство ИГУ, 2024. – С. 400-402 (РИНЦ).

7. **Михайловская, В.С.** Сравнительная оценка видового спектра возбудителей инфекций мочевыводящих путей у пациентов поликлиник и стационаров / В.С. Михайловская, Е.С. Терентьева // Материалы научно- практической конференции студентов, ординаторов, аспирантов, молодых ученых (до 35 лет) и школы «Перспективные достижения молодых ученых для практического здравоохранения». – Пермь: ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера, 2025. – С. 280-281 (РИНЦ).

8. Вожакова, С.А. Подбор оптимальной питательной среды для культивирования новых пробиотических штаммов *Escherichia coli* Q5 и C41 / С.А. Вожакова, **В.С. Михайловская**, А.А. Елькин, М.В. Кузнецова // «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии». Сборник статей по материалам региональной научной конференции. – Пермь: ПГНИУ, 2025. – С. 10-13 (РИНЦ).

Патентные документы:

Патент № 2807738 С1 Российская Федерация, МПК А61К 35/741, С12N 1/20. Штамм бактерий *Escherichia coli* C41 для получения пробиотического препарата для профилактики

колибактериоза сельскохозяйственных животных: № 2023118002: заявл. 07.07.2023: опубл. 21.11.2023 / М.В. Кузнецова, **В.С. Михайловская**, Н.Б. Ремезовская [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук.

Патент № 2806907 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А61К 35/741. Штамм бактерий *Escherichia coli* Q5, перспективный для получения пробиотического препарата для профилактики колибактериоза сельскохозяйственной птицы: № 2023118001: заявл. 07.07.2023: опубл. 08.11.2023 / М.В. Кузнецова, **В.С. Михайловская**, Н.Б. Ремезовская [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук.

Список сокращений:

ВКМ – всероссийская коллекция микроорганизмов; КОЕ – колониеобразующие единицы; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ПЦР – полимеразная цепная реакция; УФ – ультрафиолетовое излучение; ААИ – средний индекс адгезии; АС – коэффициент адгезии; АРЕС – патогенные для птиц *E. coli*; CI – доверительный интервал; ЕТЕС – энтеротоксигенные *E. coli*; ЕхРЕС – экстраинтестинальные патогенные *E. coli*; IAM – индекс адгезивности микроорганизмов; InРЕС/DEC – интестинальные патогенные/диареогенные *E. coli*; OD – оптическая плотность; OR – отношение шансов; PAI – острова патогенности; PCA – анализ главных компонент; STEC – шига-токсин продуцирующие *E. coli*; UРЕС – уропатогенные *E. coli*.

Михайловская Вероника Сергеевна

БАКТЕРИОЦИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ *ESCHERICHIA COLI*: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать
Формат 60×90/16. Усл. печ.л. 1.
Тираж 100 экз. Заказ
Набор компьютерный.

Отпечатано в «Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13