

УДК 579.254.4; 579.64; 636.4.033

UDC 579.254.4; 579.64; 636.4.033

03.00.00 Биологические науки

03.00.00 Biological sciences

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОТБОР
НЕТРАНСДУЦИРУЮЩИХ
БАКТЕРИОФАГОВ *E. COLI* ДЛЯ
ПРОТИВОКОЛИБАКТЕРИОЗНЫХ
ПРЕПАРАТОВ**

**ISOLATION AND SELECTION OF THE NON
TRANSDUCING *E. COLI* BACTERIOPHAGES
FOR ANTI-COLIBACILLOSIS DRUGS**

Скобликов Николай Эдуардович
к. мед. н.
SPIN-код: 6591-8710
skoblikow@yandex.ru

Skoblikow Nikolai Edwardovich
Cand. Med. Sci.
SPIN-code: 6591-8710
skoblikow@yandex.ru

Кононенко Сергей Иванович
д. с.-х. н., доцент
SPIN-код: 8188-4599
AuthorID: 349808
kononenko@nm.ru

Kononenko Sergei Ivanovich
Dr. Agr. Sci., Associate Professor
SPIN-code: 8188-4599
AuthorID: 349808
kononenko@nm.ru

Осепчук Денис Васильевич
д. с.-х. н.
SPIN-код: 6769-9879
ResearcherID: D-9056-2016
osepchuk81@mail.ru

Osepchuk Denis Vasilievich
Dr. Agr. Sci.
SPIN-code: 6769-9879
ResearcherID: D-9056-2016
Osepchuk81@mail.ru

Москаленко Елена Александровна
к. техн. н.
SPIN-код: 2236-3410
elalmo@yanex.ru

Moskalenko Elena Alexandrovna
Cand. Tech. Sci.
SPIN-code: 2236-3410
elalmo@yanex.ru

Авдиенко Валентина Викторовна
м. н. с.
SPIN-код: 5791-6550
veterinaria@list.ru
*Северо-Кавказский научно-исследовательский
институт животноводства, 350055, Россия, г.
Краснодар, пос. Знаменский, ул. Первомайская, 4*

Avdienko Valentina Viktorovna
Junior Researcher
SPIN-code: 5791-6550
veterinaria@list.ru
*North-Caucasus Research Institute of Animal
Husbandry, 350055, Pervomayskaya, 4, Znamensky
village, Krasnodar, Russia*

Зимин Андрей Антонович
к. б. н.
AuthorID: 81249
zimin@ibpm.pushchino.ru
*Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.
Пуцдино, Московской обл., Россия*

Zimin Andrei Antonovich
Cand. Biol. Sci.
AuthorID: 81249
zimin@ibpm.pushchino.ru
<mailto:Osepchuk81@mail.ru>
*Institute of Biochemistry and Physiology of
Microorganisms of Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow reg., Russia*

Было проведено выделение фагов *E.coli* из проб природных и сточных вод, полученных во время экспедиций в различных регионах РФ (Краснодарский и Приморский края, Астраханская и Московская области). Полученные фаги (286 изолятов) были исследованы на их способность к литической активности в отношении предварительно сформированной коллекции патогенных штаммов кишечной палочки (*Escherichia coli*, *E. coli*) – возбудителей колибактериоза у свиней в Краснодарском крае.

The isolation of *E.coli* phages from samples of natural and waste water obtained during expeditions in the different regions of Russian Federation was carried out. The obtained phages (286 isolates) were tested for their ability to lyse the pathogenic strains of *E. coli* – pathogenic agents of pig colibacteriosis in Krasnodar region. The study was conducted of their ability to phage transduction, the molecular-genetic characterization and biotechnological parameters of selected bacteriophages. For first experimental design of veterinary drugs was selected 5 coliphages having

Была проведена их молекулярно-генетическая характеристика, оценка их способности к трансдукции, биотехнологические параметры. Впервые для конструирования экспериментальных ветеринарных фаговых препаратов отобрано 5 коли-фагов, демонстрировавших литическую активность в отношении спектра патогенных *E. coli*, при этом не обладающих способностью к трансдукции плазмид. По результатам ПЦР-анализа было показано, что все исследованные фаги являются представителями фагов T4-типа семейства *Myoviridae*, различаясь при этом по спектру генов 32 и *hcs*. Исследование ростовых свойств фагов показал, что все пять отобранных фагов обладают достаточной продуктивностью для использования в качестве основы конструирования фаговых препаратов, предназначенных для контроля колибактериозов. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов 08-04-99111-р_офи, 09-04-10132-к, 16-44-230855р_а

Ключевые слова: БАКТЕРИОФАГИ, ТРАНСДУКЦИЯ ГЕНОВ, *E. COLI*, КОЛИБАКТЕРИОЗ, ФАГОТЕРАПИЯ

no ability of plasmids transduction. It has been shown that all the investigated phages are representatives of T4-type phages of family *Myoviridae*. The reported study was partially supported by RFBR, research projects No. 08-04-99111, 09-04-10132, 16-44-230855

Keywords: BACTERIOPHAGES, PHAGE TRANSDUCTION, *E. COLI*, COLIBACILLOSIS, PHAGE THERAPY

Doi: 10.21515/1990-4665-122-040

Бактериофаги – вирусы бактерий – стали использоваться в качестве лечебных средств практически сразу после их открытия, начиная с 1920-х годов [1]. В середине XX века, после открытия антибиотиков, интерес к бактериофагам, как к антибактериальным агентам, значительно снизился, особенно в западных странах [2]. Кроме того, причиной такого забвения были недостатки в методах очистки и выделения бактериофагов и не сложившаяся практика их использования в терапии [3]. Новый интерес к фагопрофилактике и фаготерапии (как и к пробиотикам [4]) возник в 1990-е годы, будучи стимулированным увеличением абсолютного и относительного количества штаммов патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам, а также ростом числа летальных исходов от инфекций, раньше не представлявших такой опасности [3, 5, 6].

По сравнению с антибиотиками, бактериофаги обладают рядом значительных преимуществ: 1) специфично действуют на определенные

виды и даже штаммы бактерий, не поражая нормофлору кишечника (благодаря этому могут сочетаться с применением пробиотических препаратов [7, 8]); 2) инертны в отношении эукариотических клеток животного (не оказывают токсического и сенсibiliзирующего эффекта); 3) способны к саморазмножению с последующей самоэлиминацией.

Несмотря на очевидные преимущества, препараты на основе бактериофагов обладают рядом недостатков, таких как: 1) возможность развития фагорезистентности; 2) узкий спектр эффективности (в рамках одного рода и даже нескольких штаммов в пределах вида бактерий); 3) относительно небольшая стабильность препаратов; 4) участие фагов в горизонтальном переносе генов. Тем не менее, при развитии инфекционного процесса, вызванного полирезистентными штаммами бактерий, бактериофаги остаются единственным средством эффективной этиотропной терапии. Что касается перечисленных недостатков бактериофагов, то в настоящее время существуют их эффективные решения. Так, фагорезистентность компенсируется чрезвычайным «эволюционным полиморфизмом» бактериофагов: в отношении каждого штамма бактериального патогена активно значительно большее количество бактериофагов. Проблема узкой направленности действия фагов решается сочетанным применением фагов с различным спектром специфичности. Относительно меньшая стабильность получаемых фаговых препаратов сейчас успешно решается с развитием методов биотехнологии, позволяющих стабилизировать хранение препарата и смягчить требования к условиям его применения.

Одним из значимых ограничений фаготерапии является участие бактериофагов в горизонтальном переносе генов – трансдукции – способности передавать от бактерии к бактерии гены, приобретённые в процессе предыдущего цикла литического развития [9, 10], в том числе – гены антибиотикорезистентности [11, 13, 14] и даже биплазмидные

системы, содержащие такие гены [12]. В медицине важность определения трансдуцирующего потенциала фагов признана одним из параметров отбора бактериофагов по критерию генетической безопасности [15]. В то же время, несмотря на интенсивный поиск новых средств контроля инфекций [16], определение трансдуцирующего потенциала бактериофагов в области ветеринарии до последнего времени обойдена вниманием.

Поскольку в качестве модели изучения трансдукции традиционно использовался такой объект, как кишечная палочка, *Escherichia coli* (*E. coli*), оптимальной моделью изучения применения нетрансдуцирующих фагов в сельском хозяйстве может служить именно эшерихиоз (колибактериоз), в особенности – колибактериозы свиней [17]. Результаты работ по изучению антибактериального потенциала нетрансдуцирующих бактериофагов на модели эшерихиозов (колибактериозов) свиней позволят установить биоразнообразие нетрансдуцирующих фагов, эффективных в отношении патогенных для свиней эшерихий, изучить их эффективность *in vivo* и разработать генетически безопасные препараты для фаготерапии.

Целью исследований было формирование и характеристика рабочей коллекции нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli* (колифагов) для последующего их использования в качестве основы экспериментальных фаговых препаратов, применяемых для профилактики колибактериоза.

Новизна исследований заключалась в том, что впервые была сформирована и молекулярно-генетически охарактеризована рабочая коллекция нетрансдуцирующих колифагов, литически активных в отношении патогенных *E. coli* – возбудителей колибактериоза поросят.

Материал и методика исследований. Формирование рабочей коллекции патогенных изолятов *E.coli*. Для определения эффективности проектируемых экспериментальных фаговых препаратов, требовалось предварительное проведение проверки их бактериолитических свойств в отношении некоторого ассортимента патогенных бактерий-мишеней. Для

этого реализовали формирование рабочей коллекции выделенных в регионе возбудителей кишечного эшерихиоза для постановки опытов *in vitro*.

Отбор патогенных изолятов *E.coli* в коллекцию производился по результатам микроскопического, культурального (бактериологического) и серологического методов микробиологической диагностики инфекций из биоматериала поросят (фекалии, секционный материал) с установленным диагнозом кишечного колибактериоза (эшерихиоза).

Для выделения колифагов из природных источников и для оценки их бактериолитической активности использовались непатогенные лабораторные штаммы *E.coli*: *B*, *BE*, *B834*, *C600*, *K-802*.

Формирование рабочей коллекции фагов *E. coli*. Для получения набора бактериофагов – потенциальных кандидатов для конструирования экспериментальных фаговых препаратов проводилось формирование рабочей коллекции фаговых изолятов. Поскольку в естественных условиях бактериофаги чаще всего обнаруживаются в экотопах бактерий-хозяев, оптимальным объектом для выделения коли-фагов являются сточные воды и фекалии животных. Отбор проб водных экосистем и сточных вод производился как в самом крае, так и в регионах России, относительно схожих по эколого-климатическим условиям с Краснодарским краем, но удалённых от него географически. Также проводилось выделение фагов из фекалий поросят и свиноматок в Краснодарском крае.

Выделение коли-фагов проводили путём высева проб на культуру лабораторных штаммов *E.coli*, инкубирования при 37°C (24 ч) и отбора образовавшихся бляшек, содержащих фаги для дальнейшего исследования.

Бактериофаги сформированной коллекции тестировались на литическую активность в отношении выделенных патогенных *E.coli*. Исследование литической активности выделенных бактериофагов в отношении патогенных *E.coli* сформированной рабочей коллекции также

проводилось по обнаружению феномена бляшкообразования на культурах бактерий, выращенных на среде *LB* [18].

Параллельно с определением активности фагов в отношении выделенных патогенных *E.coli*, проводилась оценка их способности к культивированию на непатогенных лабораторных штаммах *E.coli* для препаративного получения больших количеств фагов, поскольку при использовании в качестве основной бактериальной культуры патогенных эшерихий существует вероятность сохранения (после лизиса клеток) бактериальных токсинов в конечном препарате.

Проверка способности выделенных коли-фагов к трансдукции производилась с помощью штамма *E.coli* С600 и плазмиды *pBR322* [10].

Молекулярно-генетическая характеристика бактериофагов. Молекулярно-генетическую характеристику бактериофагов проводили для детекции генетических маркеров, характерных для фагов Т4-типа семейства *Myoviridae*, поскольку бактериофаг Т4 дикого типа не способен осуществлять трансдукцию по причине замещения в ДНК цитозина гидроксиметилцитозином, вследствие чего его геном кодирует ферменты, разрушающие цитозин-содержащую ДНК бактерий [15]. Для определения этих маркеров, а также для оценки вариабельности коли-фагов по наличию гена *hoc* (кодирующего иммуноглобулиноподобный белок капсида) использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специальными праймерами (таблица 1).

Таблица 1 - Праймеры, использовавшиеся для молекулярно-генетической характеристики бактериофагов

№ п/п	Праймер	Последовательность	Длина	T _m , °C
1	<i>MZia1</i>	5'-TGTTATIGGTATGGTICGICGTGCTAT-3'	27	60,5
2	<i>Cap8</i>	5'-TGAAGTTACCTTCACCACGACCGG-3'	24	62,8
3	<i>FR60</i>	5'-CGTAAATCTACTGCTGAACTCGC-3'	23	54,9
4	<i>FR61</i>	5'-GAATGCATCCAAATCATCAGCCAC-3'	24	58,9
5	<i>hoc1fR</i>	5'-tcgaaTTCTGATTGATTCTCCGATT-3'	(5)25	48,4 (59,6)
6	<i>hocCrH</i>	5'-ttaaagcttgAGCTGGCTACGGTGT-3'	(10)25	42,9 (61,2)

Для проведения ПЦР готовили смесь следующего состава: буфер В305 (СибЭнзайм) (60 mM Tris-HCl (pH 8.5 при 25°C); 1.5 mM MgCl₂; 25 mM KCl; 10 mM 2-меркаптоэтанол; 0.1% Тритон X-100), 2 mM MgCl₂, dNTP – 0,2 mM каждого, праймеры по 5 пмоль на пробу, ДНК-полимераза *Taq* (СибЭнзайм) по 1 единице активности на пробу. В каждую пробирку вносили по 0,2 мкл пробы фагового лизата бактерий. ПЦР проводили на амплификаторе *MJ Mini* (Bio-Rad, США) по следующей программе: 94°C – 90 с; 2 цикла: денатурация – 94°C, 45 с; отжиг — 61°C* (56 °C)**, 60 с; элонгация – 72°C, 120 с. Далее 28 циклов: денатурация – 94°C, 15 с; отжиг — 61°C для праймеров *MZia1* и *Cap8* (56°C для праймеров *FR60* и *FR61*), 30 с; элонгация – 72°C, 45 с. После окончания амплификации полученную ДНК разделяли электрофоретически в 1,2% агарозном геле, приготовленном на *TBE*-буфере [17]. Фрагменты ДНК после ПЦР разделяли в горизонтальном электрофорезе в геле 1% агарозы.

Результаты исследований и их обсуждение. Формирование рабочей коллекции патогенных изолятов *E. coli*. По результатам определения биохимической активности и проведения серологической идентификации, была сформирована рабочая коллекция (15 штаммов из шести районов Краснодарского края) выделенных в регионе патогенных *E. coli*, изолированных из биоматериала поросят с установленным диагнозом кишечного колибактериоза.

Штаммы *E. coli* с условными лабораторными номерами Ес-26 и Ес-27 были выделены от павших от эшерихиоза поросят свинофермы Тихорецкого района. Штаммы Ес-23, Ес-24, Ес-25 и Ес-29 были выделены от павших поросят двух свиноферм Кавказского района. Штаммы Ес-21 и Ес-22 были изолированы от мумифицированных плодов свиноматок, заболевших кишечным эшерихиозом. Штаммы Ес-28 (Кавказский район), Ес-31 и Ес-32 (оба – Северский район) были выделены от павших поросят.

Штаммы Ес-01 и Ес-02 (г. Краснодар), а также Ес-04 и Ес-12 (Новокубанский район) были выделены из фекалий поросят с диареей.

В качестве тестовых были отобраны штаммы *E. coli* с условными лабораторными номерами Ес-24, Ес-29, Ес-31, Ес-32.

Формирование рабочей коллекции фагов *E. coli*. Всего было отобрано и исследовано на содержание 92 пробы, послуживших источниками коли-фагов (таблица 2).

Таблица 2 - Список проб, использованных для выделения бактериофагов *E. coli*

№ п/п	Характер проб	Регион	Количество проб
1	Река Кубань в районе г. Краснодар	Краснодарский край	3
2	Река Анапчанка в черте г. Анапа	Краснодарский край	1
3	Сточные воды свинофермы	Краснодарский край	6
4	Фекалии поросят различного возраста	Краснодарский край	27
5	Фекалии свиноматок	Краснодарский край	8
6	Сточные воды с. Михайловка, Уссурийского района	Приморский край	1
7	Сточные воды г. Владивосток, Вторая р.	Приморский край	8
8	Озеро Ханка	Приморский край	5
9	Рисовые чеки в д. Архиповка Спасского района	Приморский край	14
10	Рукава реки Волга в черте г. Астрахань	Астраханская область	7
11	Река Ока в районе г. Пущино	Московская область	4
12	Пруд Бам в районе г. Пущино	Московская область	4
13	Сточные воды г. Пущино	Московская область	4

Из указанных проб было выделено 286 фагов, продемонстрировавших литическую активность в отношении лабораторных штаммов *E. coli*. Лишь 19 из 286 фагов способны лизировать хотя бы 3 из 15 патогенных штаммов *E. coli*. Активность в отношении наиболее патогенных штаммов *E. coli*, отобранных в качестве тест-штаммов (Ес-24, Ес-29, Ес31, Ес-32) продемонстрировали лишь 14 фагов. Из них лишь 12 фагов были способны к росту на трёх непатогенных лабораторных штаммах *E. coli* (В, К-802 и С-600), которые предполагалось использовать в качестве основных производственных штаммов (таблица 3).

Таблица 3 - Литическая активность бактериофагов рабочей коллекции в отношении патогенных и лабораторных *E.coli*

№ п/п	Лабораторное название фага	Лабор. № фага	Регион	Источник пробы	Литическая активность в отношении штаммов <i>E.coli</i>						
					непатогенных			патогенных			
					<i>B</i>	<i>K-802</i>	<i>C-600</i>	<i>E-24</i>	<i>E-29</i>	<i>E-31</i>	<i>E-32</i>
1	flo-01-03	3	Кр.край*	поросёнок	+	+	+	0	0	0	+
2	ПР-1-01-29	3а	Приморье**	река	0	0	0	+	+	+	+
3	ПР-1-02-29	4	Приморье	река	0	0	0	0	+	+	+
4	ВР-09-2-02	5	Приморье	река	+	0	+	0	+	+	+
5	РО-1-01	6	Приморье	река	0	+	+	0	+	+	+
6	РО-1-02	7	Приморье	река	0	+	+	0	+	0	0
7	Мих-01	8	Приморье	река	+	+	+	0	+	+	+
8	Мих-02	9	Приморье	река	+	+	+	0	0	+	+
9	Мих-03	10	Приморье	река	+	+	+	0	0	+	+
10	wat-02-e32-01	15	Кр.край	ст. воды	+	+	+	0	+	+	+
11	wat-02-e32-02	16	Кр.край	ст. воды	+	+	+	0	0	+	+
12	wat-02-e32-03	17	Кр.край	ст. воды	+	+	0	0	0	+	+
13	wat-05-e24-01	18	Кр.край	ст. воды	+	+	+	0	0	+	+
14	wat-05-e24-02	19	Кр.край	ст. воды	+	+	+	0	0	+	+

Примечание: * - Краснодарский край; ** - Приморский край.

По результатам проведения оценки способности фагов к трансдукции выяснилось, что только 5 фагов (№ 3, № 6, № 8, № 9, № 15 в таблице 3) не трансдуцировали плазмиды антибиотикорезистентности. Три из них (№ 6, № 8, № 9) были выделены из речных проб Приморского края (р-н г. Владивосток), два (№ 3, № 15) – из сельскохозяйственных экотопов свинофермы ОПХ «Рассвет», пос. Знаменский, г. Краснодар. Эти фаги были отобраны в качестве основы для экспериментальных препаратов.

Молекулярно-генетическая характеристика бактериофагов.

По результатам ПЦР-анализа отобранных фагов на наличие генетических маркеров, характерных для фагов Т4-типа, – гена 23 (праймеры *MZia1* и *Cap8*) и гена 32 (праймеры *FR60* и *FR61*) было установлено, что все фаги принадлежат к Т4-типу семейства *Myoviridae*. Причём, если по наличию гена 23 (кодирующего основной белок капсида) были положительны все 5 фагов, то по гену 32 – только фаг № 6 (рис. 1).

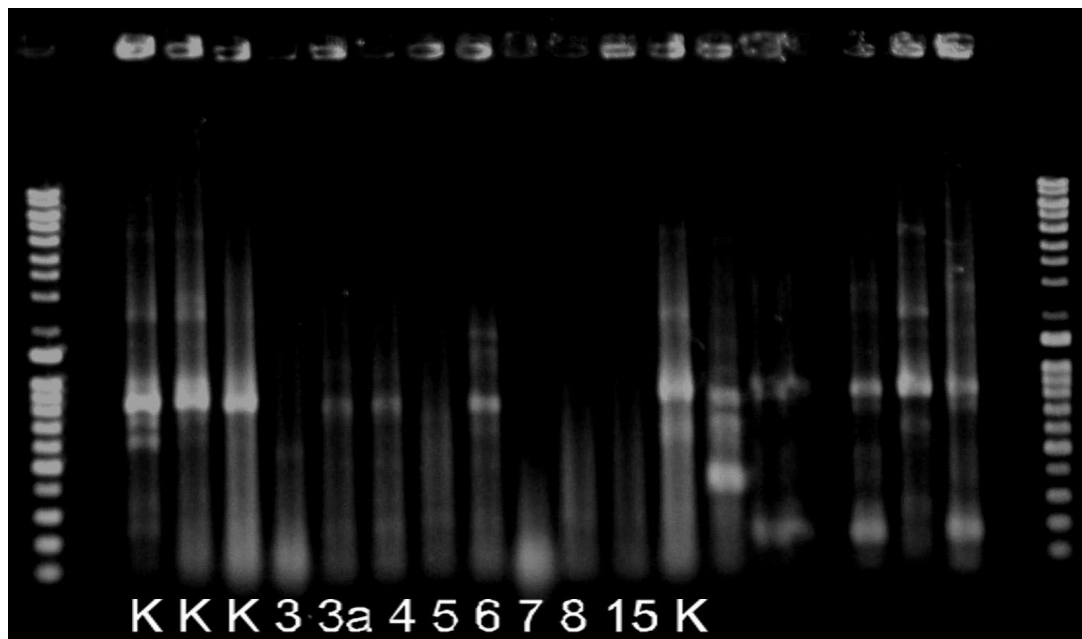


Рис. 1. - Электрофореграмма продуктов амплификации фагов с праймерами *FR60* и *FR61*

К – фаги Т4 (положительный контроль); 3-15 – фаги с соответствующими лабораторными номерами.

Результаты исследования вариабельности Т4-фагов по наличию гена *hoc* показали, что из пяти отобранных фагов № 3 и № 6 были отрицательны, остальные – положительны (рис. 2).

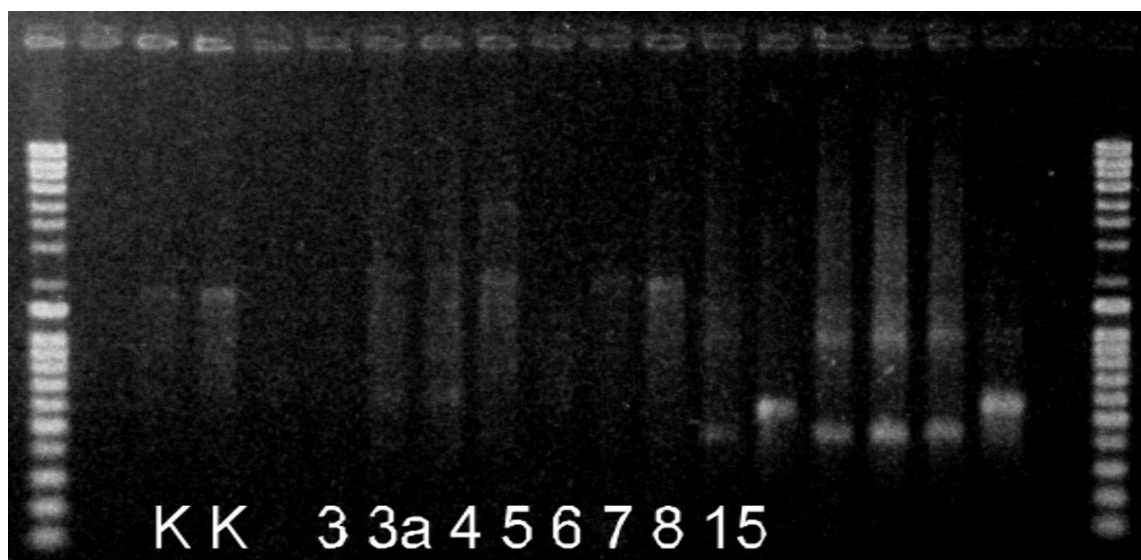


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации фагов с праймерами *hoc1fR* и *hocCrH*

К – фаги Т4 (положительный контроль); 3-15 – фаги с соответствующими лабораторными номерами.

Заключение

В результате проведенных исследований был отработан алгоритм выделения и отбора коли-фагов из природных экотопов различных регионов РФ, характеризующихся экологической схожестью, но географической удаленностью. При этом из рабочей коллекции из 286 природных бактериофагов, выделенных из природных и сточных вод, всего 5 фагов были нетрансдуцирующими плазмиды антибиотико-резистентности, эффективные в отношении патогенных *E. coli*. Все пять фагов характеризовались высокой продуктивностью при культивировании на непатогенных лабораторных штаммах *E. coli*. По данным молекулярно-генетического анализа все отобранные фаги являлись бактериофагами T4-типа семейства *Myoviridae*; при этом отмечалась их вариабельность по наличию генов 32 и *hoc*. Полученные результаты послужат основой для конструирования новых эффективных и генетически безопасных фаговых препаратов для сельского хозяйства.

Список литературы

1. *d'Herelle F.* Bacteriophage: its Role in Immunity. Baltimore: Williams & Wilkins, 1922. 287 p.
2. *Inal, J.M.* Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics // Arch. Immunol. Ther. Exp. 2003. V. 51. № 4. P. 237-244.
3. *Summers, W.C.* Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology. New Haven, CT: Yale University Press, 1999. 230 p.
4. Кощаев, А.Г. Пробиотик Трилактобакт в кормлении перепелов / А.Г. Кощаев, О.В. Кощаева, С.А. Калюжный // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2014. № 95. С. 633-647. Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2014/01/pdf/04.pdf>
5. *Barrow P. A. and Soothill J. S.* Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential // Trends in Microbiology 1997. №. 5. P. 268-271.
6. *Follet G.* Antibiotic Resistance In The EU Science, Politics, And Policy // AgBioForum. 2000. V. 3. № 2-3. P. 148-155.
7. Скобликов Н.Э. Комбинированное применение нетрансдуцирующих бактериофагов *E.coli* с пробиотиком в пост-отъемном периоде у поросят / Н.Э. Скобликов, С.И. Кононенко, А.А. Зимин // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2012. - №78. - С. 599-609. Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/04/pdf/61.pdf><http://ej.kubagro.ru/2012/04/61/>

8. Скобликов Н.Э. Эффективность различных способов применения нетрансдуцирующих бактериофагов *e.coli* для профилактики пост-отъёмной диареи поросят / Н.Э. Скобликов, С.И. Кононенко, А.А. Зимин // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2012. – №78. С. 653 – 664. Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/04/pdf/60.pdf>
9. Morse ML, Lederberg EM, Lederberg J. Transduction in *Escherichia coli* K-12 // Genetics. 1956. V. 41. № 1. P.142–156.
10. Saunders J. R., Allison H., James C. E. Phage-mediated transfer of virulence genes // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2001. V.76. P.662–666.
11. Таяшин, В.И. Трансдукция детерминант антибиотикорезистентности плазмид псевдо-Т-четными бактериофагами / В.И. Таяшин, А.А. Зимин, М.Г. Шляпников, А.М. Боронин // Генетика. 2003. Т. 39. №7. С. 1-13.
12. Таяшин, В.И. Котрансдукция плазмид системы рЕТ мутантами бактериофагов Т4 и RB43 / В.И. Таяшин, А.А. Зимин, А.М. Боронин // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 785 – 791.
13. Wilson G.G., Young K.K.Y., Edlin G.J., Konigsberg W.J. High frequency generalized transduction by bacteriophage T4 // Nature. 1979. V. 280. № 17. P. 80-82.
14. Young K.K.Y., Edlin G.J. Physical and genetical analysis of bacteriophage T4 generalized transduction // Molec.Gen.Genet. 1983. V. 192. P. 241-249.
15. Sulakvelidze, A., and E. Kutter. Bacteriophage therapy in humans, p. 381-436. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton: CRC Press, 2005. 513 p.
16. Masatoshi Yoichi, Masatomo Morita, Katsunori Mizoguchi et al. The criterion for selecting effective phage for *Escherichia coli* O157:H7 control // Biochem. Engineering J. 2004. V 19. P. 221-227.
17. Fairbrother J. M., Nadeau E., Gyles C. L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies // Anim Health Res Rev. 2005. V.6. № 1. P. 17-39.
18. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т.И. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. Изд-во: М.: Мир, 1984. 480 с.

References.

1. d'Herelle F. Bacteriophage: its Role in Immunity. Baltimore: Williams & Wilkins, 1922. 287 p.
2. Inal, J.M. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics // Arch. Immunol. Ther. Exp. 2003. V. 51. № 4. P. 237-244.
3. Summers, W.C. Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology. New Haven, CT: Yale University Press, 1999. 230 p.
4. Koshhaev, A.G. Probiotik Trilaktobakt v kormlenii perepelov / A.G. Koshhaev, O.V. Koshhaeva, S.A. Kaljuzhnyj // Politematicheskij setevoy jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2014. № 95. S. 633-647. Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2014/01/pdf/04.pdf>
5. Barrow P. A. and Soothill J. S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential // Trends in Microbiology 1997. №. 5. P. 268-271.
6. Follet G. Antibiotic Resistance In The EU Science, Politics, And Policy // AgBioForum. 2000. V. 3. № 2-3. P. 148-155.
7. Skoblikov N. Je. Kombinirovannoe primenenie netransducirujushhih bakteriofagov E.coli s probiotikom v post-ot#jomnom periode u porosjat / N. Je. Skoblikov, S. I. Kononenko,

- A.A. Zimin // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2012. - №78. - S. 599-609. Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2012/04/pdf/61.pdf><http://ej.kubagro.ru/2012/04/61/>
8. Skoblikov N.Je. Jefferektivnost' razlichnyh sposobov primeneniya netransducirujushhih bakteriofagov e.coli dlja profilaktiki post-ot#jomnoj diarei porosjat / N.Je. Skoblikov, S.I. Kononenko, A.A. Zimin // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2012. – №78. S. 653 – 664. Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2012/04/pdf/60.pdf>
 9. Morse ML, Lederberg EM, Lederberg J. Transduction in Escherichia coli K-12 // Genetics. 1956. V. 41. № 1. P.142–156.
 10. Saunders J. R., Allison H., James C. E. Phage-mediated transfer of virulence genes // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2001. V.76. P.662–666.
 11. Tanjashin, V.I. Transdukcija determinant antibiotikorezistentnosti plazmid pseudo-T-chetnymi bakteriofagami / V.I. Tanjashin, A.A. Zimin, M.G. Shljapnikov, A.M. Boronin // Genetika. 2003. T. 39. №7. S. 1-13.
 12. Tanjashin, V.I. Kotransdukcija plazmid sistemy pET mutantami bakteriofagov T4 i RB43 / V.I. Tanjashin, A.A. Zimin, A.M. Boronin // Mikrobiologija. 2003. T. 72. № 6. S. 785 – 791.
 13. Wilson G.G., Young K.K.Y., Edlin G.J., Konigsberg W.J. High frequency generalized transduction by bacteriophage T4 // Nature. 1979. V. 280. № 17. P. 80-82.
 14. Young K.K.Y., Edlin G.J. Physical and genetical analysis of bacteriophage T4 generalized transduction // Molec.Gen.Genet. 1983. V. 192. P. 241-249.
 15. Sulakvelidze, A., and E. Kutter. Bacteriophage therapy in humans, p. 381-436. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton: CRC Press, 2005. 513 p.
 16. Masatoshi Yoichi, Masatomo Morita, Katsunori Mizoguchi et al. The criterion for selecting effective phage for Escherichia coli O157:H7 control // Biochem. Engineering J. 2004. V 19. P. 221-227.
 17. Fairbrother J. M., Nadeau E., Gyles C. L. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies // Anim Health Res Rev. 2005. V.6. № 1. P. 17-39.
 18. Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekuljarnoe klonirovanie / T.I. Maniatis, Je. Frich, Dzh. Sjembruk. Izd-vo: M.: Mir, 1984. 480 c.