

ПРОБИОТИЧЕСКИЕ КОНСОРЦИУМЫ: СТРУКТУРА И АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И НОРМОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА (НА ПРИМЕРЕ *ESCHERICHIA COLI*) *IN VITRO*

РЕЗЮМЕ

Пеньдюхова А.С.,
Белькова Н.Л.,
Савинова Ю.С.,
Воропаева Н.М.,
Смулова Н.Е.,
Клименко Е.С.,
Кондратов И.Г.,
Семёнова Н.В.,
Рычкова Л.В.

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

Авторы, ответственные за переписку:

Пеньдюхова Анна Сергеевна,
e-mail: annapend@yandex.ru;
Белькова Наталья Леонидовна,
e-mail: nlbelkova@gmail.com

Актуальность. Применение пробиотических препаратов на основе консорциумов микроорганизмов не только способствует восстановлению баланса кишечной микробиоты, но и увеличивает терапевтический эффект пробиотиков. Перспективными источниками получения пробиотических консорциумов являются кисломолочные продукты, подвергшиеся естественному сквашиванию при помощи спонтанно сформировавшихся микробных консорциумов.

Цель работы. Изучение структуры пяти микробных консорциумов с пробиотическими свойствами из кисломолочных продуктов естественного брожения и оценка их антагонистической активности в отношении условно-патогенных бактерий и представителя нормобиоты человека – *Escherichia coli* – *in vitro*.

Материалы и методы. Анализ структуры бактериальных консорциумов проводили методами секвенирования. Антагонистическую активность консорциумов оценивали диско-диффузионным методом.

Результаты. Установлено, что исследуемые микробные консорциумы представлены бактериями *Enterococcus spp.* и *Streptococcus spp.* В консорциумах № 1, № 2 и № 3 доминировали бактерии рода *Enterococcus*, в то время как в консорциумах № 4 и № 5 – *Streptococcus*. Показана антагонистическая активность в отношении четырёх изолятов условно-патогенных бактерий: *Klebsiella pneumoniae* № 493, *Enterobacter hormaechei* № 372, *Staphylococcus aureus* № 4 и *Pseudomonas aeruginosa* № 25 ИМБ, а также одного представителя нормобиоты человека – *Escherichia coli* № 495. Наибольшая зона задержки роста отмечена у изолята *E. coli* № 495. У трёх тест-культур (*K. pneumoniae* № 509, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* № 3 ИМБ) наблюдался более плотный рост вокруг дисков с пробиотическими консорциумами.

Заключение. Результаты исследования показали, что влияние пробиотических консорциумов, отличающихся составом микроорганизмов, может быть нейтральным и бактерицидным. Наличие антагонистической активности у исследуемых микробных консорциумов в отношении полирезистентных изолятов условно-патогенных бактерий – перспектива для создания пробиотиков с антибактериальными свойствами.

Ключевые слова: пробиотики, структура микробных консорциумов, рибосомная таксономия, условно-патогенные бактерии, антагонистическая активность

Для цитирования: Пеньдюхова А.С., Белькова Н.Л., Савинова Ю.С., Воропаева Н.М., Смулова Н.Е., Клименко Е.С., Кондратов И.Г., Семёнова Н.В., Рычкова Л.В. Пробиотические консорциумы: структура и антагонистическая активность в отношении условно-патогенных бактерий и нормобиоты человека (на примере *Escherichia coli*) *in vitro*. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(4): 20-31. doi: 10.29413/ABS.2023-8.4.3

Статья поступила: 14.07.2023

Статья принята: 29.08.2023

Статья опубликована: 28.09.2023

PROBIOTIC CONSORTIUMS: STRUCTURE AND ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST OPPORTUNISTIC BACTERIA AND HUMAN NORMOBIOTA (USING THE EXAMPLE OF *ESCHERICHIA COLI*) IN VITRO

Pendyukhova A.S.,
Belkova N.L.,
Savinova J.S.,
Voropaeva N.M.,
Smurova N.E.,
Klimenko E.S.,
Kondratov I.G.,
Semenova N.V.,
Rychkova L.V.

Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems
(Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003,
Russian Federation)

Corresponding authors:
Anna S. Pendyukhova,
e-mail: annapend@yandex.ru;
Natalia L. Belkova,
e-mail: nlbelkova@gmail.com

ABSTRACT

Background. Using probiotic preparations based on consortia of microorganisms not only helps to restore the balance of the intestinal microbiota, but also increases the therapeutic effect of probiotics. Promising sources for obtaining probiotic consortia are milk products that have undergone natural fermentation with the help of spontaneously formed microbial consortia.

The aim. To study the structure of five microbial consortia with probiotic properties from naturally fermented milk products and to assess in vitro their antagonistic activity against opportunistic bacteria and a representative of the human normobiota – *Escherichia coli*.

Materials and methods. The structure of bacterial consortia was analyzed by sequencing methods. The antagonistic activity of the consortia was assessed by the disk diffusion method.

Results. It has been established that the studied microbial consortiums are represented by *Enterococcus* spp. and *Streptococcus* spp. bacteria. In consortiums No. 1, No. 2, and No. 3, *Enterococcus* bacteria dominated, while in consortiums No. 4 and No. 5, *Streptococcus* dominated. Antagonistic activity was shown against four isolates of opportunistic bacteria: *Klebsiella pneumoniae* No. 493, *Enterobacter hormaechei* No. 372, *Staphylococcus aureus* No. 4 and *Pseudomonas aeruginosa* No. 25 IMB, as well as against one representative of the human normobiota – *Escherichia coli* No. 495. The highest growth delay zone is found in *E. coli* No. 495 isolate. Three test cultures (*K. pneumoniae* No. 509, *E. coli* ATCC25922 and *P. aeruginosa* No. 3 IMB) exhibited more dense growth around probiotic consortia.

Conclusion. The results of the study showed that the effect of probiotic consortia differing in the composition of microorganisms can be neutral and bactericidal. The presence of antagonistic activity in the studied microbial consortia against multiresistant isolates of opportunistic bacteria is a prospect for creating probiotics with antibacterial properties.

Key words: probiotics, structure of microbial consortia, ribosomal taxonomy, opportunistic pathogens, antagonistic activity

For citation: Pendyukhova A.S., Belkova N.L., Savinova J.S., Voropaeva N.M., Smurova N.E., Klimenko E.S., Kondratov I.G., Semenova N.V., Rychkova L.V. Probiotic consortiums: Structure and antagonistic activity against opportunistic bacteria and human normobiota (using the example of *Escherichia coli*) in vitro. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(4): 20-31. doi: 10.29413/ABS.2023-8.4.3

Received: 14.07.2023
Accepted: 29.08.2023
Published: 28.09.2023

ОБОСНОВАНИЕ

Актуальным способом восстановления баланса микробиоты желудочно-кишечного тракта является применение пробиотических препаратов [1]. В последнее время большое внимание уделяется консорциумам пробиотических микроорганизмов, использование которых позволяет достигать ожидаемых положительных эффектов от приёма пробиотиков [2]. В симбиотическом консорциуме происходит взаимное усиление биологических свойств отдельных штаммов, что даёт возможность создать единую биологическую систему, обладающую защитными свойствами от влияния других микроорганизмов. Чаще всего среди микроорганизмов, обладающих пробиотической активностью, коммерческий интерес имеют представители таких родов, как *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* и *Enterococcus* [1].

Одним из направлений получения мультиштаммовых препаратов является формирование естественной популяции микроорганизмов. Согласно исследованиям, перспективными источниками таких популяций могут быть кисломолочные продукты, полученные путём естественного сквашивания [3–5]. В таком случае микроорганизмы самостоятельно формируют консорциумы с определёнными функциональными свойствами. Естественные сформированные популяции микроорганизмов могут обладать высокой степенью стабильности и синергетическим эффектом, что делает их привлекательными для использования в качестве пробиотиков. Примером формирования таких популяций может служить значительное изменение видового разнообразия заквасочных культур микроорганизмов, которые, тем не менее, позволяют получить изделия, соответствующие ГОСТ [6].

В процессе скрининга некоторых коммерческих заквасок, предназначенных для ферментации молока, несмотря на соблюдение технологии и инструкции, были получены микробные консорциумы, при микроскопическом исследовании отличающиеся от заявленных. В то же время эти консорциумы сохраняли свои пробиотические свойства, что явилось важным фактором для изучения их таксономической структуры и антагонистической активности.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение структуры пяти микробных консорциумов с пробиотическими свойствами из кисломолочных продуктов естественного брожения и оценка их антагонистической активности в отношении условно-патогенных бактерий и представителя нормобиоты человека – *Escherichia coli* – *in vitro*.

МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись пять микробных консорциумов с пробиотическими свойствами, получен-

ные из кисломолочных продуктов естественного брожения. В качестве *тест-культур* использовали 56 изолятов бактерий, из которых: 16 – относятся к нормобиоте кишечника; 4 – эталонные штаммы; 36 – изоляты условно-патогенных бактерий с множественной антибиотикорезистентностью (АБР), входящие в «Коллекцию микробиоты человека Иркутской области» ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (НЦ ПЗСРЧ) [7]. Видовой состав тест-культур бактерий представлен в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1
ВИДОВОЙ СОСТАВ ТЕСТ-КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ
TABLE 1
SPECIES COMPOSITION OF BACTERIAL TEST CULTURES

Вид микроорганизма	Количество изолятов, абс.
Нормобиота человека	
<i>Escherichia coli</i> НФА	16
Эталонный штамм	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1
Условно-патогенные бактерии	
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Enterobacter hormaechei</i>	1
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
<i>Klebsiella variicola</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Escherichia coli</i> СФА	3
<i>Escherichia coli</i> ГА	2
Эталонные штаммы	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1

Примечание. НФА – нормальная ферментативная активность; СФА – слабая ферментативная активность; ГА – гемолитическая активность.

Дизайн исследования

1. Изучение структуры пяти пробиотических консорциумов:

- а) секвенирование ампликонов нового поколения (NGS, next generation sequencing);
- б) секвенирование 16S фрагмента рибосомного оперона по методу Сэнгера.

2. Тестирование антагонистической активности пяти пробиотических консорциумов в отношении культур условно-патогенных бактерий и представителя нормобиоты человека – *Escherichia coli* – *in vitro*.

Методы исследования

1а. Анализ структуры бактериальных консорциумов проводили методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 переменных фрагментов гена 16S рРНК. ДНК из накопительных культур выделяли коммерческим набором Quick-DNA Miniprep Kits (Zymo Research, США). Амплификацию целевого фрагмента проводили на высококонсервативных бактериальных праймерах NGS318L и NGS806R с адаптерами (табл. 2). Полученные ампликоны очищали от праймеровых димеров с использованием AMPure XP (Beckman Coulter, США) по протоколу производителя.

Секвенирование по технологии Illumina проводили в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной метеорологии».

Обработку результатов NGS и таксономическую аннотацию проводили с использованием платформы QIIME2 v. 2022.2 и базы данных нуклеотидных последовательностей SILVA 138.

1б. Идентификацию доминирующих бактерий, входящих в консорциум, проводили с помощью рибосомной филогении, используя участок, включающий V3–V8 переменные районы гена 16S рРНК. Для амплификации данного фрагмента были использованы праймеры 500F и 1350R (табл. 2). Ампликоны, полученные в процессе полимеразной цепной реакции (ПЦР) очищали в 1%-м агарозном геле и встраивали в рJET1.2-вектор согласно протоколу производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Кольцевую плазмиду трансформировали в компетентные клетки *E. coli* XL-1 [8] и осуществляли прямой скрининг всех выросших колоний на наличие вставки нужной длины на плазмидных праймерах рJET1.2-F и рJET1.2-R (табл. 2).

Сиквенсную реакцию вели с использованием реагентов Brilliant Dye Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (NimaGen, Нидерланды) согласно протоколу производителя.

Ампликоны секвенировали по Сэнгеру на приборе Нанофор-05 в ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» НЦ ПЗСРЧ.

Сиквенсы корректировали визуально в программе Bioedit v. 7.2.5. Видовую идентификацию проводили путём сравнения нуклеотидной последовательности с ба-

**ТАБЛИЦА 2
СТРУКТУРЫ ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ**

**TABLE 2
THE STRUCTURE OF PRIMERS USED IN THE STUDY**

Название	Структура (5'-3')	Условия ПЦР
NGS318F	TCGTCGGCAGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	<u>Шаг 1, Цикл = 01</u> T1 = 95 °C; t = 3 мин <u>Шаг 2, Цикл = 25</u> T1 = 95 °C; t = 30 с T2 = 55 °C; t = 30 с T3 = 72 °C; t = 30 с
NGS806R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCMGGGTATCTAATCCKGTT	<u>Шаг 3, Цикл = 01</u> T1 = 72 °C; t = 5 мин
500F	GTGCCAGCAGCCGCGTAA	<u>Шаг 1 Цикл = 01</u> T1 = 95 °C; t = 5 мин <u>Шаг 2, Цикл = 25</u> T1 = 94 °C; t = 30 с T2 = 60 °C; t = 30 с T3 = 72 °C; t = 1 мин
1350R	GACGGGCGGTGTGTACAAG	<u>Шаг 3, Цикл = 01</u> T1 = 72 °C; t = 5 мин
рJET1.2-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	<u>Шаг 1, Цикл = 01</u> T1 = 95 °C; t = 3 мин <u>Шаг 2, Цикл = 25</u> T1 = 94 °C; t = 30 с T2 = 60 °C; t = 30 с T3 = 72 °C; t = 1 мин
рJET1.2-R	AAGAACATCGATTTCCATGGCAG	<u>Шаг 3, Цикл = 01</u> T1 = 72 °C; t = 5 мин

зами NCBI NR и EMBL-ENA Sequences с помощью BLAST и FASTA соответственно.

2. Определение антагонистической активности пробиотических консорциумов проводили диско-диффузионным методом, согласно стандартной методике определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам [9]. В качестве дисков использовали фильтры из боросиликатного стекла Glass Microfiber Filters (GF/F) (Whatman plc., Великобритания) диаметром 0,5 см, на которые пипеткой наносили суспензии тестируемых консорциумов в объёме 15 мкл. Общее содержание микробных клеток в каждом консорциуме составляло 10^{10} – 10^{11} КОЕ/см³. Чашки культивировали при 37° С в течение 24 часов.

Измерение зон задержки роста (ЗЗР) тест-культур с учётом диаметра фильтра осуществляли по результатам двух отдельных экспериментов с помощью графического редактора ImageJ v. 1.5.3, позволяющего производить анализ изображений. При ЗЗР от 6,0 мм и выше консорциум считали проявляющим антагонизм. Данные представлены в виде среднего арифметического диаметров зон подавления роста тест-культур (M) и среднеквадратичного отклонения (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам высокопроизводительного секвенирования в состав микробных консорциумов в качестве доминантных бактерий вошли *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp. (табл. 3).

ТАБЛИЦА 3

СТРУКТУРА МИКРОБНЫХ КОНСОРЦИУМОВ С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ, %

TABLE 3

STRUCTURE OF MICROBIAL CONSORTIA WITH PROBIOTIC PROPERTIES, %

Характеристика таксона	№ микробного консорциума				
	1	2	3	4	5
<i>Enterococcus</i>	89,8	69,2	51,7	0,2	0,6
<i>Streptococcus</i>	7,2	25,2	36,9	86,6	88,3
Другие	2,22	5,32	8,88	10,48	9,95

Доля сопутствующих бактерий варьировала от 2,22 до 10,48 %. В консорциумах № 1 и № 2 доминировали представители рода *Enterococcus*, в консорциумах № 4 и № 5 – *Streptococcus*, в то время как в консорциуме № 3 относительное содержание представителей этих родов составило 51,7 % и 36,9 % соответственно.

Идентификация доминирующих бактерий на основе рибосомной таксономии показала, что в консорциуме № 1 были определены два вида энтерококков – *Enterococcus durans* и *Enterococcus thailandicus* (табл. 4). Консорциум № 2 оказался более богат по разнообразию энтерококков: дополнительно к вышеперечисленным видам в нём был идентифицирован *Enterococcus faecium*. Кроме того, 25,2 % в структуре микробного консорциума составили стрептококки. Они идентифицированы как *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus thermophilus*. В консорциуме № 3 энтерококки представлены видом *E. durans*, а стрептококки – видами *S. salivarius* и *S. thermophilus*. Состав консорциума № 4 представлен монокультурой *S. thermophilus*, в то время как в составе консорциума № 5 дополнительно к *S. thermophilus* был определён *Lactobacillus brevis*.

Филогенетический анализ показал, что для бактерий рода *Enterococcus* последовательности сформировали либо самостоятельные ветви, либо вместе с последовательностями типовых штаммов (рис. 1).

E. durans представлен в структуре консорциумов № 1, № 2 и № 3; *E. faecium* определён в консорциуме № 2; *E. thailandicus* – в консорциуме № 1.

Для оценки эколого-генетической характеристики энтерококков, входящих в состав исследуемых консорциумов, было проанализировано разнообразие биотопов гомологичных штаммов, среди которых встречались ферментированные молочные продукты, слюна, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека и животных, фекалии (рис. 2).

Представители консорциумов № 1, № 2 и № 3 показали филогенетическое родство с изолятами, выделенными из биотопа кишечника человека (рис. 2, выделены зелёным цветом), человеческого грудного молока и пищевых молочных продуктов (рис. 2, выделены голубым цветом) и из вагинального биотопа (рис. 2, выделены красным цветом).

Разделение исследуемых последовательностей и гомологичных штаммов из базы данных NCBI на фекальный, молочный и вагинальный биотопы указывает на генетические различия микроорганизмов из разных экологических групп. Такие различия могут обуславливать различную степень проявления пробиотических свойств. Изучение эколого-генетических характеристик микроорганизмов с пробиотическими свойствами поможет сформировать сбалансированные микробиоценозы для конкретных биотопов человека [10].

На рисунке 3 представлено филогенетическое дерево, построенное по V3–V8 вариабельным фрагментам гена 16S рРНК для флотипов, отнесённых к роду *Streptococcus*, и гомологичных изолятов из разных биотопов.

Наблюдается различие между представителями консорциумов № 2, № 4 и № 5, которые обособились в самостоятельные ветви. На дереве видно, что представители консорциума № 2 имели гомологию с изолятом *S. salivarius* H4. Также все исследуемые консорциумы были представлены флотипами, показавшими гомологию с изолятами *S. thermophilus*. *Изоляты-гомоло-*

ТАБЛИЦА 4
РИБОСОМНАЯ ТАКСОНОМИЯ БАКТЕРИЙ,
ДОМИНИРУЮЩИХ В МИКРОБНЫХ КОНСОРЦИУМАХ
С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

TABLE 4
RIBOSOMAL TAXONOMY OF BACTERIA DOMINATED
IN MICROBIAL CONSORTIA WITH PROBIOTIC PROPERTIES

Маркировка клональной последовательности	Ближайший бактериальный гомолог	Процент гомологии, %
Консорциум №1		
1.10; 1.27	<i>Enterococcus durans</i> HBUAS54304	99,4; 100
1.19; 1.28	<i>Enterococcus durans</i> IPLA 655	99,5; 99,5
1.20; 1.21; 1.23	<i>Enterococcus thailandicus</i> LM4-1	99,4–99,5
1.25	<i>Enterococcus thailandicus</i> Marseille-AA00296	99,8
Консорциум №2		
2.1	<i>Enterococcus thailandicus</i> LM4-1	100
2.2	<i>Enterococcus thailandicus</i> Colony540	99,4
2.6	<i>Enterococcus durans</i> HBUAS54304	100
2.8	<i>Streptococcus salivarius</i> H4	99,4
2.10	<i>Enterococcus faecium</i> HBUAS66260	99,6
2.11	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST106	99,9
2.13	<i>Enterococcus durans</i> ABRIINW.N3	99,6
Консорциум №3		
3.1	<i>Streptococcus salivarius</i> H4	99,1
3.3	<i>Enterococcus durans</i> ULAG	98,7
3.4; 3.7; 3.11	<i>Streptococcus thermophilus</i> с 21.5	97,8–98,4
3.8	<i>Enterococcus durans</i> HBUAS54304	99,4
3.10	<i>Streptococcus thermophilus</i> STN57	97,9
Консорциум №4		
4.1;	<i>Streptococcus thermophilus</i> ASR-1	98,8
4.2; 4.3	<i>Streptococcus thermophilus</i> IMAU:80427	99,1; 98,8
4.5	<i>Streptococcus thermophilus</i> ChR-I-str19	99,8
4.6; 4.7; 4.8	<i>Streptococcus thermophilus</i> BL13-10	99,0–99,8
Консорциум №5		
5.1	<i>Streptococcus thermophilus</i> ChR-I-str19	99,6
5.3; 5.2; 5.4; 5.5; 5.6; 5.8	<i>Streptococcus thermophilus</i> BL13-10	97,9–99,5
5.7	<i>Streptococcus thermophilus</i> PT110	84,4

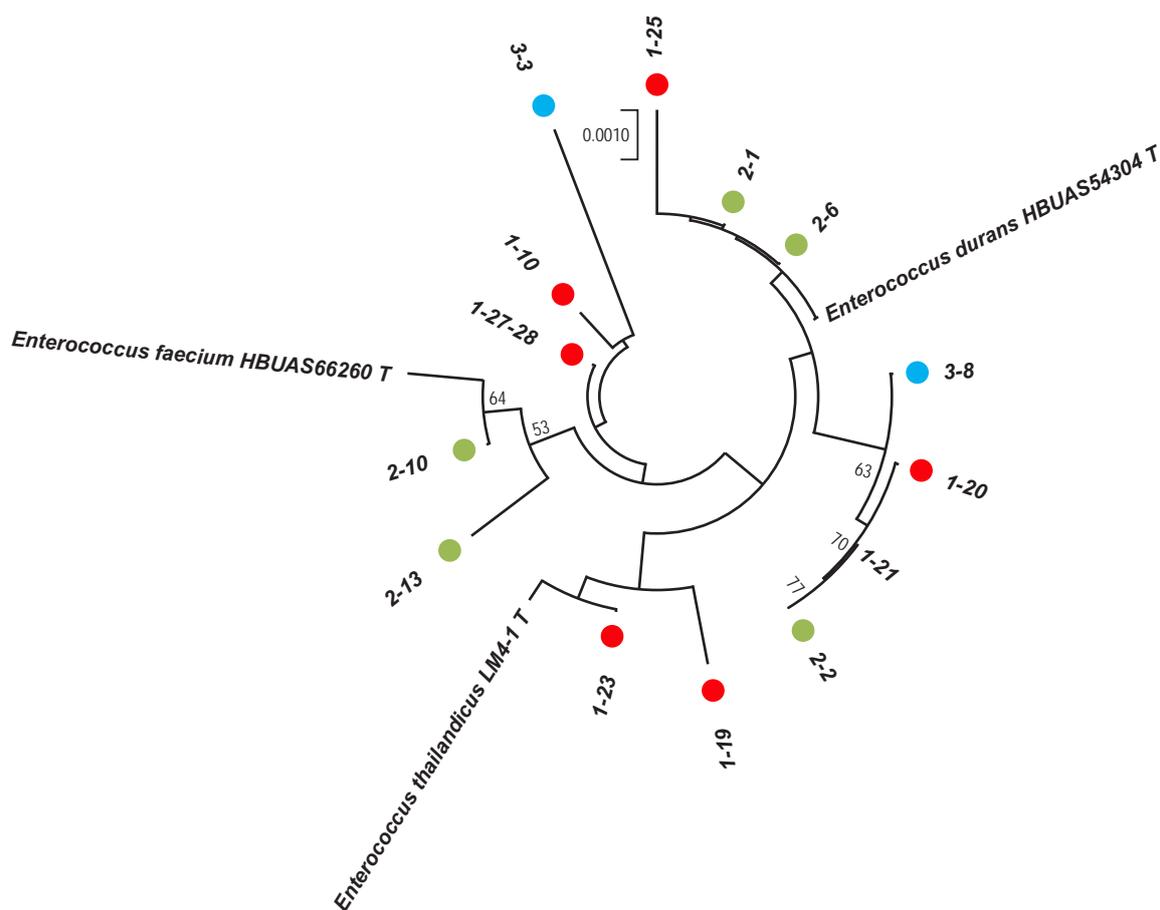


РИС. 1.
Филогенетическое дерево, построенное по V3–V8 переменным фрагментам гена 16S рНК для фило типов, отнесённых к роду *Enterococcus*, и типовых штаммов: в узлах приведены значения бутстрэп-поддержки (%) выше 50

FIG. 1.
Phylogenetic tree based on V3–V8 variable fragments of the 16S rRNA gene for phylotypes assigned to the genus *Enterococcus* and type strains: the nodes show values of bootstrap support (%) above 50

ги были получены из различных молочных продуктов и биотопа ротовой полости человека.

Наличие антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) является одной из основных характеристик штамма для отнесения его к пробиотическим видам. Результаты исследования показали, что влияние исследуемых пробиотических консорциумов, отличающихся составом микроорганизмов, может быть нейтральным, и бактерицидным: антагонистическая активность отмечена в отношении пяти изолятов тест-культур (табл. 5).

Все пробиотические консорциумы подавляли рост двух изолятов: УПМ – *K. pneumoniae* № 493 и представителя нормобиоты кишечника – *E. coli* № 495. Максимальная зона подавления роста отмечена у изолята *E. coli* № 495 с консорциумом № 3. Консорциумы № 1, № 2, № 4 и № 5 проявляли антагонистическую активность в отношении *E. hormaechei* № 372, консорциумы № 1, № 3 и № 5 – в отношении *S. aureus* № 4, консорциум № 3 – в отношении *P. aeruginosa* № 25 ИМБ.

У трёх тест-культур был отмечен более плотный рост вокруг фильтров с пробиотическими консорциумами: у изолята *K. pneumoniae* № 509 и эталонного штамма *E. coli*

ATCC 25922 – вокруг дисков со всеми пятью консорциумами, у изолята *P. aeruginosa* № 3 ИМБ – вокруг дисков с консорциумами № 1, № 2, № 3 и № 4 (рис. 4). Данный факт требует дальнейшего детального изучения с применением методик, предназначенных для оценки рост-стимулирующих свойств бактерий.

За последнее время было опубликовано достаточно много работ по применению пробиотиков на основе *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. и их полезных свойств для организма человека. Пробиотические штаммы энтерококков и стрептококков широко используются для коррекции дисбиоза кишечника человека, а также при хронических заболеваниях ЖКТ [11, 12]. Штамм *S. thermophilus* относится к группе молочнокислых бактерий, которые сбраживают сахара до молочной кислоты, оказывая подкисляющее действие и обеспечивая бактерицидный эффект в отношении многих патогенных микроорганизмов [13]. Культуры энтерококков с давних времён применяли для приготовления пищи из мяса, молока и овощей. Небольшое содержание энтерококков в мясных и молочных продуктах не позволяет размножаться патогенным стафилококкам и кишечным палочкам [14]. Известно, что антибактериальная активность энтерококков связана с их способностью

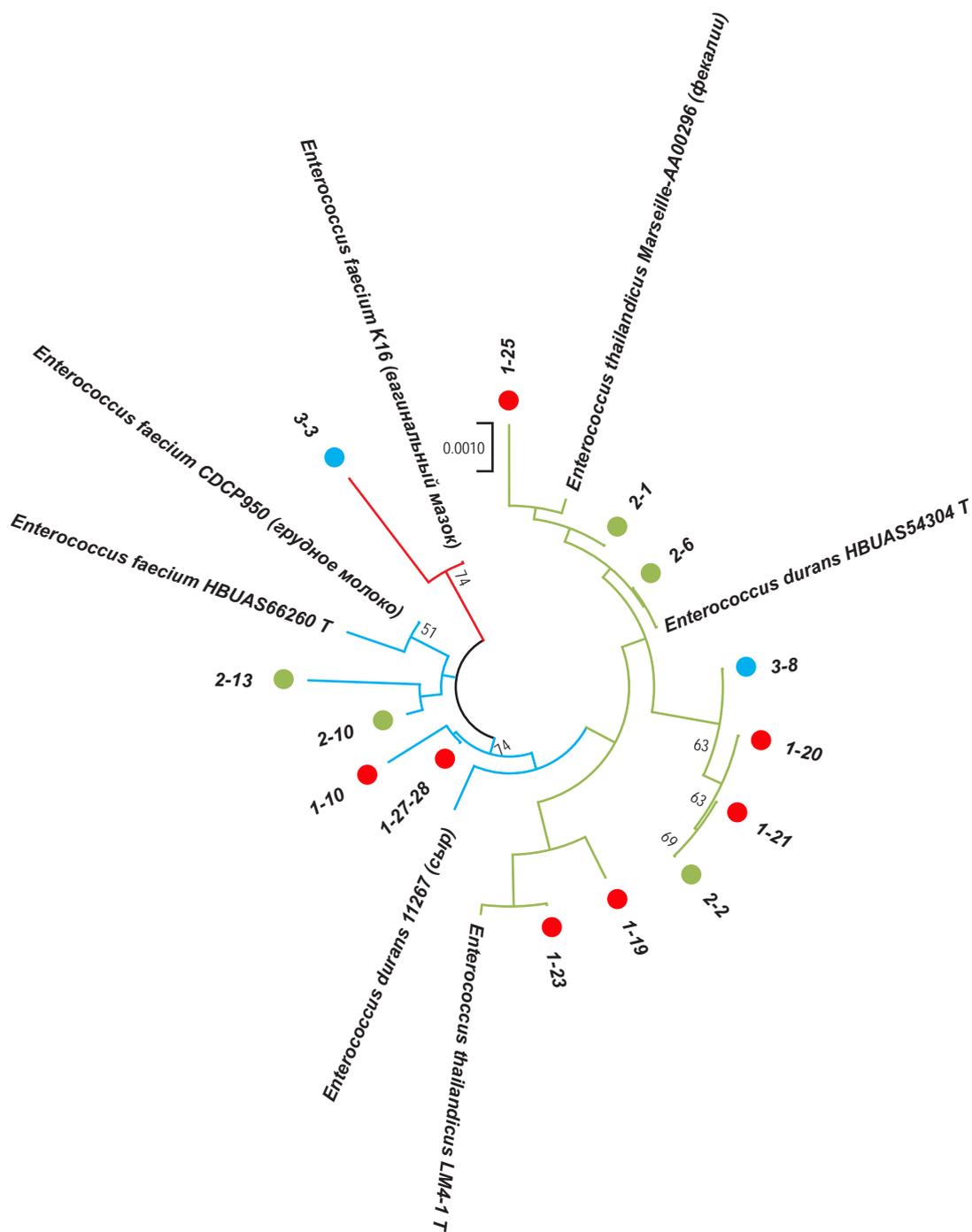


РИС. 2. Филогенетическое дерево, построенное по V3–V8 переменным фрагментам гена 16S рРНК для флотипов, отнесённых к роду *Enterococcus*, типовых штаммов и гомологичных штаммов из различных биотопов: в узлах приведены значения бутстрэп-поддержки (%) выше 50

FIG. 2. Phylogenetic tree based on V3–V8 variable fragments of the 16S rRNA gene for phylotypes assigned to the genus *Enterococcus*, type strains and homologous strains from various biotopes: the nodes show values of bootstrap support (%) above 50

синтезировать специфические белки – энтероцины А, В, L50А/В, Р, Q и Х α / β . Наличие таких белков определяет антагонистическую активность энтерококков по отношению к возбудителям инфекций, таким как *S. aureus*, *E. coli*, а также *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Streptococcus* spp., *Listeria* spp. и *Clostridium* spp. [15, 16]. Полученные нами данные по антагонистической активности пробиотических консорциумов на основе *Streptococcus* spp.

и *Enterococcus* spp. соответствуют данным, найденным в литературе. Однако тестируемые изоляты обладают множественной антибиотикорезистентностью, а значит, являются более адаптированными к воздействию отрицательных факторов окружающей среды. Вероятно, этим можно объяснить выборочную чувствительность резистентных изолятов одного вида УПМ к действию пробиотических консорциумов.

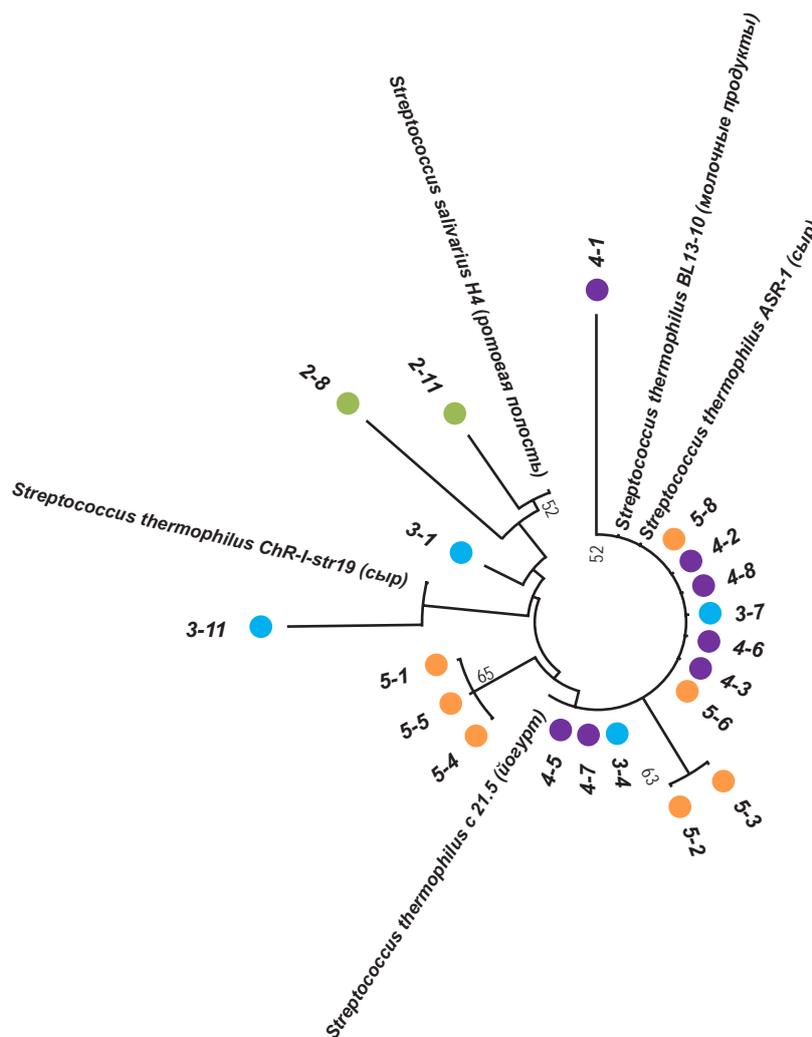


РИС. 3.

Филогенетическое дерево, построенное по V3–V8 переменным фрагментам гена 16S рРНК для фило типов, отнесённых к роду *Streptococcus*, и гомологичных штаммов: в узлах приведены значения бутстрэп-поддержки (%) выше 50

FIG. 3.

Phylogenetic tree based on V3–V8 variable fragments of the 16S rRNA gene for phylotypes assigned to the genus *Streptococcus* and homologous strains: the nodes show values of bootstrap support (%) above 50

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были изучены таксономическая структура и антагонистическая активность пяти микробных консорциумов с потенциальными пробиотическими свойствами. С помощью молекулярно-генетических методов было установлено, что исследуемые микробные консорциумы представлены бактериями *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp. В консорциумах № 1, № 2 и № 3 доминировали бактерии рода *Enterococcus*, в то время как в консорциумах № 4 и № 5 – *Streptococcus*. Представители рода *Enterococcus* были идентифицированы как *E. durans*, *E. thailandicus*, *E. faecium*; род *Streptococcus* был представлен видами *S. salivarius* и *S. thermophilus*.

Показано, что влияние пробиотических консорциумов, отличающихся составом микроорганизмов, может быть нейтральным и бактерицидным. Исследуемые пробиотические консорциумы подавляли рост четырёх изолятов условно-патогенных бактерий, таких как *Klebsiella pneumoniae* № 493, *Enterobacter hormaechei* № 372,

Staphylococcus aureus № 4 и *Pseudomonas aeruginosa* № 25 ИМБ, а также одного представителя нормобиоты человека – *Escherichia coli* № 495. Наибольшая зона задержки роста отмечена у изолята *E. coli* № 495 в присутствии консорциума № 3.

Наличие антагонистической активности у исследуемых микробных консорциумов в отношении полирезистентных изолятов условно-патогенных бактерий может быть перспективой для создания пробиотических препаратов с антибактериальными свойствами в условиях массового распространения лекарственной устойчивости микроорганизмов.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках государственной темы № 121101300054-4.

Конфликт интересов

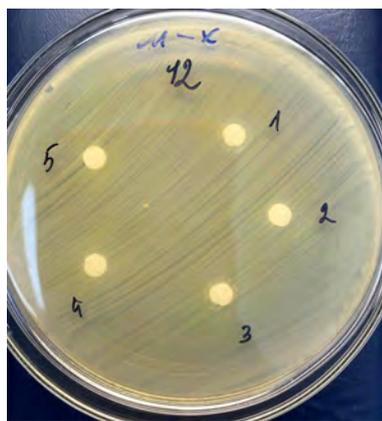
Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ТАБЛИЦА 5
АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
ПРОБИОТИЧЕСКИХ КОНСОРЦИУМОВ ПО ОТНОШЕНИЮ
К УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ И НОРМОБИОТЕ
ЧЕЛОВЕКА

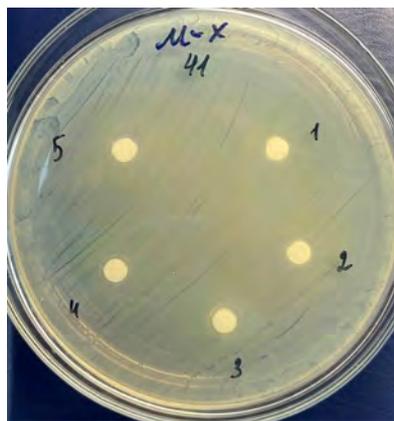
TABLE 5
ANTAGONISTIC ACTIVITY OF PROBIOTIC CONSORTIA
IN RELATION TO OPPORTUNISTIC BACTERIA AND HUMAN
NORMOBIOTA

№ п/п	Вид микроорганизма (№ изолята) / характеристика ^a	Зоны задержки роста, мм (M ± m)				
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
1	<i>Proteus mirabilis</i> (№ 371) / УПМ, АБР	0	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,2	0	0
2	<i>Enterobacter hormaechei</i> (№ 372) / УПМ, АБР	6,7 ± 0,3 ^б	6,2 ± 0,2 ^б	5,7 ± 0,2	6,3 ± 0,3 ^б	7,0 ± 0,2 ^б
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (№ Г) / УПМ, АБР	5,4 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2
4	<i>Enterobacter cloacae</i> (№ 394) / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	0	5,2 ± 0,1
5	<i>Klebsiella oxytoca</i> (№ 439) / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,3 ± 0,2	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (№ 493) / УПМ, АБР	6,8 ± 0,3 ^б	6,4 ± 0,3 ^б	6,8 ± 0,3 ^б	6,9 ± 0,3 ^б	6,6 ± 0,3 ^б
7	<i>Klebsiella variicola</i> (№ 672) / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1
8	<i>Staphylococcus aureus</i> (№ 672), / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1
9	<i>Staphylococcus aureus</i> (№ 4) / УПМ, АБР	6,2 ± 0,3 ^б	5,9 ± 0,1	6,3 ± 0,3 ^б	5,2 ± 0,1	6,5 ± 0,3 ^б
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (№ 41ХЭ) / УПМ, АБР	5,4 ± 0,1	5,6 ± 0,3	5,4 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,3 ± 0,1
11	<i>Staphylococcus aureus</i> (№ 846) / УПМ, АБР	0	5,4 ± 0,3	5,2 ± 0,1	0	5,2 ± 0,1
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (№ 381) / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,2 ± 0,1
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (№ 25 ИМБ) / УПМ, АБР	0	5,8 ± 0,1	6,3 ± 0,3 ^б	0	5,9 ± 0,1
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (№ 54 ИМБ) / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,3 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,2 ± 0,1
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (№ 82 ИМБ) / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	0	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (№ 3 ИМБ) / УПМ, АБР	+	+	+	+	5,2 ± 0,1
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (№ 5 ИМБ) / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,2
18	<i>Enterobacter cloacae</i> (№ 25) / УПМ, АБР	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,5 ± 0,2	5,2 ± 0,1
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (№ 509) / УПМ, АБР	+	+	+	+	+
20	<i>Escherichia coli</i> (№ 473) / АБР	5,2 ± 0,2	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,2	5,2 ± 0,1
21	<i>Escherichia coli</i> (№ 495) / АБР	7,2 ± 0,3 ^б	7,9 ± 0,3 ^б	8,2 ± 0,3 ^б	7,4 ± 0,3 ^б	7,3 ± 0,3 ^б
22	<i>Escherichia coli</i> (№ 6Г) / нормобиота	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,2	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1
23	<i>Escherichia coli</i> (№ 133ХЭ) / нормобиота	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,2	0	5,2 ± 0,1
24	<i>Escherichia coli</i> (АТСС 25922) / эталонный штамм	+	+	+	+	+

Примечание. ^a – характеристика изолята; УПМ – условно-патогенный микроорганизм; АБР – наличие множественной антибиотикорезистентности; 0 – нет влияния; + – более плотный рост тест-культуры вокруг фильтра; ^б – консорциум проявил антагонизм.



а



б



в

РИС. 4.

Рост тест-культур вокруг фильтров с пробиотическими консорциумами: **а** – *Klebsiella pneumoniae* № 509; **б** – *Escherichia coli* ATCC 25922; **в** – *Pseudomonas aeruginosa* № 3 ИМБ; 1 – консорциум № 1; 2 – консорциум № 2; 3 – консорциум № 3; 4 – консорциум № 4; 5 – консорциум № 5

FIG. 4.

Growth of test cultures around filters with probiotic consortiums: **a** – *Klebsiella pneumoniae* No. 509; **b** – *Escherichia coli* ATCC 25922; **v** – *Pseudomonas aeruginosa* No. 3 IMB; 1 – consortium No. 1; 2 – consortium No. 2; 3 – consortium No. 3; 4 – consortium No. 4; 5 – consortium No. 5

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Савинова Ю.С., Белькова Н.Л., Семёнова Н.В., Рычкова Л.В. История, современные направления и перспективы развития про- и пребиотических препаратов в России и за рубежом. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-1): 211-227. [Savinova YuS, Belkova NL, Semenova NV, Rychkova LV. History, current trends and prospects for the development of pro- and prebiotic drugs in Russia and abroad. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-1): 211-227. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-1.23

2. Целипанова Е.Е. Флорин® форте – отечественный поликомпонентный сорбированный препарат-пробиотик. *Главный врач Юга России*. 2020; 2(72): 31-32. [Tselipanova EE. Florin® Forte is a domestic multi-component sorbed probiotic drug. *Glavnyy vrach Yuga Rossii*. 2020; 2(72): 31-32. (In Russ.)].

3. Занданова Т.Н. Исследование пробиотических свойств бактериального концентрата. *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2022; 3: 109-119. [Zandanova TN. Probiotic properties study of bacterial concentrate. *Storage and Processing of Farm Products*. 2022; 3: 109-119. (In Russ.)]. doi: 10.36107/spfp.2022.311

4. Бегунова А.В., Савинова О.С., Моисеенко К.В., Глазунова О.А., Рожкова И.В., Фёдорова Т.В. Характеристика и функциональные свойства лактобацилл, выделенных из кефирных грибков. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021; 57(4): 362-373. [Begunova AV, Savinova OS, Moiseenko KV, Glazunova OA, Rozhkova IV, Fedorova TV. Characterization and functional properties of lactobacilli isolated from kefir grains. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2021; 57(4): 362-373. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S0555109921040036

5. Нестерова Е.Ю., Сыромятников М.Ю., Попов В.Н. Оценка бактериального состава сметаны с помощью высокопроизводительного секвенирования. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2021; 83(3-89): 129-134. [Nesterova EY, Syromyatnikov MY, Popov VN. Evaluation of the bacterial composition of sour cream using high-throughput sequencing. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2021; 83(3-89): 129-134. (In Russ.)]. doi: 10.20914/2310-1202-2021-3-129-134

6. Локачук М.Н., Хлесткин В.К., Савкина О.А., Кузнецова Л.И., Павловская Е.Н. Изменение микробиоты густой ржаной закваски в процессе длительного ведения. *Хлебопродукты*. 2020; 11: 33-37. [Lokachuk MN, Khlestkin VK, Savkina OA, Kuznetzova LI, Pavlovskaya EN. Change in the microbiota of dense rye starter during long-term maintenance. *Khleboprodukty*. 2020; 11: 33-37. (In Russ.)]. doi: 10.32462/0235-2508-2020-29-11-33-37

7. Воропаева Н.М., Немченко У.М., Ситникова К.О., Савилов Е.Д., Чemezова Н.Н., Григорова Е.В., и др. Частота встречаемости штаммов с множественной антибиотикорезистентностью в структуре условно-патогенных микроорганизмов. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-1): 145-153. [Voropaeva NM, Nemchenko UM, Sitnikova KO, Savilov ED, Chemezova NN, Grigorova EV, et al. Frequency of strains with multiple antibiotic resistance in the structure of opportunistic pathogens. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-1): 145-153. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-1.16

8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Lab. Press*; 1989.

9. *Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: Методические указания*. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2021. [Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs: Guidelines. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of Russia; 2021. (In Russ.)].

10. Rudenko P, Vatnikov Yu, Sachivkina N, Rudenko A, Kulikov E, Lutsay V, et al. Search for promising strains of probiotic microbiota isolated from different biotopes of healthy cats for use in the control of surgical infections. *Pathogens*. 2021; 10(6): 667. doi: 10.3390/pathogens10060667

11. Пунченко Е.В., Морозова О.В., Еремеева Н.Б. Новые возможности использования пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3. *Проблемы медицинской микологии*. 2022; 24(2): 121. [Punchenko EV, Morozova OV, Eremeeva NB. New possibilities of using probiotic strain *Enterococcus faecium* L3. *Problems in Medical Mycology*. 2022; 24(2): 121. (In Russ.)]

12. Ермоленко Е.И., Котылева М.П., Цапиева А.Н., Карасева А.Б., Буй Т., Суворов А.Н. Терапия синдрома раздраженного ки-

шечника у жителей Вьетнама пробиотическими энтерококками. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021; 12: 35-43. [Ermolenko EI, Kotyleva MP, Tsiapieva AN, Karaseva AB, Bui T, Suvorov AN. Irritable bowel syndrome therapy in Vietnam with probiotic enterococci. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021; 12: 35-43. (In Russ.)]. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-196-12-35-43

13. Markakiou S, Gaspar P, Johansen E, Zeidan AA, Neves AR. Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2020; 61: 142-152. doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.019

14. Бормотова Е.А., Гупалова Т.В., Суворов А.Н. Способ создания рекомбинантного штамма энтерококка L3-SARS на основе биологически активного штамма *Enterococcus faecium* L3. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2023; 3(1): 64-71. [Bormotova EA, Gupalova TV, Suvorov AN. Method for creating a recombinant strain of enterococcus L3-SARS based on biologically active strain *Enterococcus faecium* L3. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2023; 3(1): 64-71. (In Russ.)]. doi: 10.18705/2782-3806-2023-3-1-64-71

15. Афанасова Е.Н., Бочанова Е.Н., Гордина О.В., Бердиев Ш.А., Иванова О.В. Энтерококки: современное значение для медицинской практики. *Современные проблемы науки и образования*. 2022; 2: 144. [Afanasova EN, Bochanova EN, Gordina OV, Berdiev ShA, Ivanova OV. Enterococcus: Modern importance for medical practice. *Modern Problems of Science and Education*. 2022; 2: 144. (In Russ.)]. doi: 10.17513/spno.31555

16. Ермоленко Е.И., Котылева М.П., Цапиева А.Н., Карасева А.Б., Буй Тхи Лан Ан, Буй Тхи Хьонг, и др. Влияние аутопробиотических энтерококков различных видов на микробиоту кишечника жителей Ханоя при терапии синдрома раздраженного кишечника. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*. 2020; 1-2: 82. [Ermolenko EI, Kotyleva MP, Tsiapieva AN, Karaseva AB, Bui Thi Lan An, Bui Thi Huong, et al. Effects of autoprobiotic enterococci of various species on the intestinal microbiota of Hanoi residents during therapy irritable bowel syndrome. *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga*. 2020; 1-2: 82. (In Russ.)].

Сведения об авторах

Пеньдюхова Анна Сергеевна – лаборант-исследователь лаборатории биомедицинской микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: annapend@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0009-0398-4598>

Белькова Наталья Леонидовна – кандидат биологических наук, доцент, заведующая лабораторией микробиома и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nlbelkova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9720-068X>

Савинова Юлия Сергеевна – заведующая лабораторией биомедицинской микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: alisaalisa2222@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8183-1233>

Воропаева Наталья Михайловна – научный сотрудник лаборатории биомедицинской микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: n.m.shabanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7026-2522>

Смурова Надежда Евгеньевна – лаборант-исследователь лаборатории микробиома и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nadinasmurova@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0004-3614-6631>

Клименко Елизавета Станиславовна – младший научный сотрудник лаборатории микробиома и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: klimenko.elizabet@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0979-8816>

Кондратов Илья Геннадьевич – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально-значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: kondratovig@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Семёнова Наталья Викторовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории патофизиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: natkor_84@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6512-1335>

Рычкова Любовь Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0117-2563>

Information about the authors

Anna S. Pendyukhova – Clinical Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: annapend@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0009-0398-4598>

Natalia L. Belkova – Cand. Sc. (Biol.), Docent, Head of the Laboratory of Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: nlbelkova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9720-068X>

Julia S. Savinova – Head of the Laboratory of Biomedical Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: alisaalisa2222@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8183-1233>

Natalya M. Voropaeva – Research Officer at the Laboratory of Biomedical Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: n.m.shabanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7026-2522>

Nadezhda E. Smurova – Clinical Research Assistant at the Laboratory of Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: nadinasmurova@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0004-3614-6631>

Elizaveta S. Klimenko – Junior Research Officer at the Laboratory of Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: klimenko.elizabet@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0979-8816>

Ilya G. Kondratov – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Epidemically and Socially Significant Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: kondratovig@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Natalya V. Semanova – Dr. Sc. (Biol.), Chief Research Officer at the Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: natkor_84@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6512-1335>

Lyubov V. Rychkova – Dr. Sc. (Med.), Professor, Corresponding Member of the RAS, Director, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0117-2563>