

Выживаемость ассоциаций микроорганизмов на основе биосовместимых штаммов молочнокислых и спорообразующих бактерий в условиях *in vitro*, аналогичных для различных отделов пищеварительного тракта сельскохозяйственной птицы

РИШ. С. МУХАММАДИЕВ^{1,2}, РИН. С. МУХАММАДИЕВ^{1,2}, Л. Р. ВАЛИУЛЛИН^{1,2}, М. Г. БАРЫШЕВ¹, Д. В. ДЕМИН¹, И. Г. КАРИМУЛЛИНА², В. Г. ГУМЕРОВ², А. С. МУХАММАДИЕВА², Д. А. СОРОКИНА², А. И. ЯРУЛЛИН², Д. Н. МИНГАЛЕЕВ²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, ул. Институт, вл. 5, р.п. Большие Вяземы, Одинцовский р-н, Московская обл., 143050, Российская Федерация

²Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Научный городок, 2, Казань, 420008, Российская Федерация

Резюме. Исследования проводили с целью оценки выживаемости ассоциаций микроорганизмов на основе молочнокислых и спорообразующих бактерий в условиях *in vitro*, аналогичных для различных отделов пищеварительного тракта сельскохозяйственной птицы для последующего создания поливидовых пробиотиков. Объектами исследований служили подобранные по принципу биосовместимости 4 ассоциации микроорганизмов, а именно *L. acidophilus* и *B. subtilis*, *L. plantarum* и *B. subtilis*, *L. rhamnosus* и *B. subtilis*, *P. acidactici* и *B. subtilis*. Имитацию их транзита через желудочно-кишечный тракт птицы проводили в модифицированной среде MRS при значениях pH 5,0, 3,0 и 7,0 (соответствует зобу, желудку и кишечнику) и длительности инкубации от 60 до 150 мин при температуре 40 °С. После культивирования вегетативных клеток штамма *B. subtilis* совместно с *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* или *P. acidilactici* в указанных условиях их количество относительно контроля составило соответственно 71,4, 68,2, 65,2 и 60,8 %, а микроорганизмов штаммов *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* или *P. acidilactici* – 87,9, 82,5, 97,9 и 52,9 %. В среде с 1,0 % желчи цыплят-бройлеров численность *L. acidophilus*, *L. plantarum* или *L. rhamnosus* при совместной инкубации со штаммом *B. subtilis* была равна соответственно 24,9, 21,8 и 47,2 %, а *B. subtilis* – в среднем 46...49 % относительно контроля. Для изученных ассоциаций отмечено увеличение индекса формирования биопленок, по сравнению с монокультурами, на 15,6...24,7 %.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, бактериальные ассоциации, выживаемость, пробиотики, птицеводство.

Сведения об авторах: Риш. С. Мухаммадиев, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник (e-mail: tashir9891@mail.ru); Рин. С. Мухаммадиев, кандидат биологических наук, научный сотрудник; Л. Р. Валиуллин, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; Д. В. Демин кандидат биологических наук, научный сотрудник; М. Г. Барышев, доктор биологических наук, директор; И. Г. Каримуллина, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; В. Г. Гумеров, доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник; А. С. Мухаммадиева, аспирант, младший научный сотрудник; Д. А. Сорокина, аспирант, младший научный сотрудник; А. И. Яруллин, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; Д. Н. Мингалеев доктор биологических наук, директор.

Для цитирования: Выживаемость ассоциаций микроорганизмов на основе биосовместимых штаммов молочнокислых и спорообразующих бактерий в условиях *in vitro*, аналогичных для различных отделов пищеварительного тракта сельскохозяйственной птицы / Риш. С. Мухаммадиев, Рин. С. Мухаммадиев, Л. Р. Валиуллин и др. // Достижения науки и техники АПК. 2024. Т. 38. № 6. С. 39–45. doi: 10.53859/02352451_2024_38_6_39

Survival of microbial associations based on biocompatible strains of lactic acid and spore-forming bacteria under *in vitro* conditions similar to those for various sections of poultry digestive tract

Rish. S. Mukhammadiev^{1,2}, Rin. S. Mukhammadiev^{1,2}, L. R. Valiullin^{1,2}, D. V. Demin¹, M. G. Baryshev¹, I. G. Karimullina², V. G. Gumerov², A. S. Mukhammadieva², D. A. Sorokina², A. I. Yarullin², D. N. Mingaleev²

¹All-Russian Research Institute of Phytopathology, ul. Institut, vl. 5, r.p. Bol'shie Vyazemy, Odintsovskii r-n, Moskovskaya obl., 143050, Russian Federation

²Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchnyi gorodok, 3, Kazan, 420008, Russian Federation

Abstract. The studies were conducted to assess the survival of microorganism associations based on lactic acid and spore-forming bacteria under *in vitro* conditions similar to those in various sections of the digestive tract of agricultural poultry for the subsequent creation of polyspecies probiotics. The objects of the studies were 4 microorganism associations selected for biocompatibility, namely *L. acidophilus* and *B. subtilis*, *L. plantarum* and *B. subtilis*, *L. rhamnosus* and *B. subtilis*, *P. acidactici* and *B. subtilis*. Their transit through the gastrointestinal tract of poultry was simulated in a modified MRS medium at pH values of 5.0, 3.0 and 7.0 (corresponding to the crop, stomach and intestine) and an incubation time of 60 to 150 min at a temperature of 40 degrees Celsius. After culturing vegetative cells of the *B. subtilis* strain together with *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* or *P. acidilactici* under the specified conditions, their number relative to the control was 71.4, 68.2, 65.2 and 60.8%, respectively, and the microorganisms of the *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* or *P. acidilactici* strains were 87.9, 82.5, 97.9 and 52.9%. In a medium with 1.0% bile of broiler chickens, the number of *L. acidophilus*, *L. plantarum* or *L. rhamnosus* during co-incubation with the *B. subtilis* strain was equal to 24.9, 21.8 and 47.2%, respectively, and *B. subtilis* was on average 46-49% relative to the control. For the studied associations, an increase in the biofilm formation index was observed, compared to monocultures, by 15.6-24.7%.

Keywords: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, bacterial associations, survival, probiotics, poultry farming.

Author Details: Rish. S. Mukhammadiev, Cand. Sc. (Biol.), senior research fellow (e-mail: tashir9891@mail.ru); Rin. S. Mukhammadiev, Cand. Sc. (Biol.), research fellow; L. R. Valiullin, Cand. Sc. (Biol.), leading research fellow; D. V. Demin Cand. Sc. (Biol.), leading research fellow; M. G. Baryshev, D. Sc. (Biol.), director; I. G. Karimullina, Cand. Sc. (Biol.), senior research fellow; V. G. Gumerov, D. Sc. (Vet.), leading researcher fellow; A. S. Muhammadieva, postgraduate student, junior research fellow; D. A. Sorokina, postgraduate student, junior research fellow; A. I. Yarullin, Cand. Sc. (Biol.), leading research fellow; D. N. Mingaleev Sc. (Vet.), director.

For citation: Mukhammadiev RishS, Mukhammadiev RinS, Valiullin LR, et al. [Survival of microbial associations based on biocompatible strains of lactic acid and spore-forming bacteria under *in vitro* conditions similar to those for various sections of poultry digestive tract]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2024;38(6):39–45. Russian. doi: 10.53859/02352451_2024_38_6_39

На сегодняшний день в России и за рубежом повышенное внимание уделяют промышленному птицеводству в связи с ростом спроса на мясо и яйца птицы – ценные источники животного белка [1, 2]. Непрерывное увеличение численности жителей планеты (к 2030 г. оно достигнет 8,4 млрд человек, а к 2050 г. – 9,6 млрд человек) обостряет проблему обеспечения населения высококачественным продовольствием и интенсифицирует дальнейшее развитие отрасли птицеводства [1, 3]. Увеличение производства ее продукции обусловлено широким применением антибиотиков, которое направлено на повышение продуктивности птиц и профилактику инфекций, вызываемых различными бактериями из родов *Escherichia*, *Salmonella* и *Campylobacter* [4, 5, 6]. Проблема формирования антибиотикорезистентности патогенных бактерий, негативное влияние антибиотиков на микробиоту кишечника и иммунитет сельскохозяйственных животных стала причиной общеевропейского запрета на использование этих препаратов в сельском хозяйстве (Регламент (ЕС) № 1831/2003). В России принят закон, согласно которому запрещено вносить antimicrobные препараты в корма животных и реализовывать корма, приготовленные с их использованием, без рецепта ветеринарного специалиста (№ 463-ФЗ). Необходимость минимизации или полного исключения применения антибиотиков в птицеводстве обуславливает использование биологически активных препаратов, действие которых направлено на увеличение переваривания и доступности трудноусвояемых компонентов кормов, формирование и нормализацию кишечных микробных сообществ, профилактику и лечение заболеваний пищеварительной системы птицы [1, 7]. Подобные положительные эффекты реализуют живые штаммы строго отобранных микроорганизмов, или пробиотики [3, 8].

Анализ многочисленных отечественных и зарубежных работ подтверждает эффективность штаммов молочнокислых и спорообразующих бактерий в качестве пробиотиков для разных кроссов сельскохозяйственной птицы [9, 10]. В последние годы особое внимание исследователи уделяют поиску и характеристике пробиотических свойств новых бактериальных штаммов, обладающих чрезвычайно высоким метаболическим потенциалом [11, 12]. В этой связи бесспорен переход от моноштаммового подхода к поливидовому/полиштаммовому с целью использования синергической способности различных пробиотических штаммов [4, 12].

Одним из основных факторов, ограничивающих применение в птицеводстве штаммов микроорганизмов – потенциальных кандидатов в пробиотики, можно считать их устойчивость к желудочно-кишечным стрессам [8, 13]. Транзит через пищеварительный тракт животного сопровождается воздействием на микроорганизмы различных стрессорных факторов – пищеварительных ферментов и кислот желудка, недостатка источников питания, высокой осмолярности среды, солей желчных кислот кишечника, способных существенно повреждать бактериальные клетки и снижать их метаболическую активность, выживаемость и функциональность [14, 15]. Наиболее серьезные стрессоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) – кислоты и желчь. Под воздействием желудочного сока и желчи лактобациллы ко времени

поступления в кишечник животного могут терять до 90 % своего функционального потенциала [13, 16].

В связи с изложенным, значительная часть представленных в отечественной и зарубежной литературе сведений относится к исследованиям устойчивости штаммов молочнокислых и спорообразующих бактерий к различным значениям pH и концентрациям желчи [12, 17, 18]. Информация, которая касается оценки выживаемости ассоциаций микроорганизмов на основе биосовместимых штаммов указанных бактерий в условиях, имитирующих их транзит через пищеварительный тракт животного, практически отсутствует и представлена несколькими зарубежными работами [19, 20]. Дальнейшие исследования в этом направлении открывают перспективы для разработки эффективных пробиотиков, которые состоят из нескольких бактериальных культур, способных оказывать взаимное положительное влияние на функциональные характеристики.

Цель исследований – оценка выживаемости ассоциаций микроорганизмов на основе биосовместимых штаммов молочнокислых и спорообразующих бактерий в условиях *in vitro*, аналогичных для различных отделов пищеварительного тракта сельскохозяйственной птицы для создания поливидовых пробиотиков.

Условия, материалы и методы. В работе использовали пробиотические штаммы молочнокислых (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*) и спорообразующей (*Bacillus subtilis*) бактерий из фонда Коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (Московская обл., Россия) и Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности (Казань, Россия). Бактериальные штаммы поддерживали выращиванием в пробирках при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$: молочнокислых бактерий – на питательных средах MRS (Condalab, Испания), бациллы – LB (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Объектами исследований служили подобранные по принципу биосовместимости бактериальные ассоциации на основе *L. acidophilus* и *B. subtilis* – ассоциация № 1, *L. plantarum* и *B. subtilis* – ассоциация № 2, *L. rhamnosus* и *B. subtilis* – ассоциация № 3, *P. acidilactici* и *B. subtilis* – ассоциация № 4. Биосовместимость штаммов бактерий устанавливали методом, предложенным ранее [12]. Взаимодействие бактериальных штаммов оценивали путем совместного выращивания на поверхности различных плотных питательных сред. Выращивание бактерий осуществляли при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24...48 ч. Особенности взаимодействий штаммов бактерий выявляли визуально по характеру роста и развития их колоний: 1 тип – антагонизм – подавляющее влияние подсеваемой культуры на рост исследуемого штамма; 2 тип – нейтралитет – независимый рост исследуемой культуры; 3 тип – синергизм – стимулирующее действие исследуемого штамма подсеваемой культуры.

Культивирование штаммов бактерий проводили на модифицированной среде MRS, позволяющей совместно выращивать различные виды молочнокислых микроорганизмов и *Bacillus subtilis*. Питательная среда имела следующий состав (г/л): глюкоза – 21,0; мясопептонный бульон – 20,0; дрожжевой экстракт – 5,0; пептон – 2,0; ацетат натрия – 4,0; сульфат аммония – 2,0; фосфат калия – 1,5; сульфат магния – 0,1; сульфат марганца – 0,05; pH среды – 7,0 [12]. Бактериальную

сuspензию клеток бациллы смешивали в равных объемах с сuspензией клеток одной из молочнокислых бактерий до конечной концентрации каждого штамма $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл. Полученную сuspензию смешанной культуры разбавляли в соотношении 1:100 свежим MRS бульоном. Бактерии выращивали в течение 8 ч в термостатической камере при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и интенсивности качения 150 об/мин. После этого отбирали 0,1 мл культуральной жидкости, готовили ряд разведений и высевали на среды MRS (для молочнокислых бактерий) и LB (для бациллы) агар для подсчета количества вегетативных клеток (КОЕ/мл) [19].

Устойчивость бактериальных ассоциаций к pH и имитацию их транзита через желудочно-кишечный тракт сельскохозяйственной птицы оценивали *in vitro* методом, изложенным в других работах [8, 13]. Для этого бактериальные клетки сuspензий, полученных при совместном культивировании штаммов, последовательно выдерживали при pH 5,0 в течение 60 мин (соответствует зобу), pH 3,0 в течение 90 мин (соответствует желудку) и pH 7,0 в течение 150 мин (соответствует кишечнику) при $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$. Корректировку pH сuspензий клеток смешанных культур до необходимых значений осуществляли 1,0 М HCl или 1 М NaOH. На каждом этапе проводили отбор аликвот сuspензий клеток по 0,1 мл для определения КОЕ/мл путем десятикратных разведений (чашечный способ). Инкубацию посевов осуществляли при 37°C в течение 48 ч. Для подсчета числа жизнеспособных клеток бактерий использовали ранее упомянутые среды MRS и LB агар. Контролем служили моновиовые культуры бактерий.

Устойчивость бактериальных ассоциаций к желчи оценивали *in vitro* методом, изложенным в других работах [8, 13]. Для эксперимента использовали желчь цыплят-бройлеров, которую стерилизовали с использованием мембранного фильтра Millex (диаметр пор 0,22 мкм, Millipore, Германия). Для этого бактериальные сuspензии, полученные при совместном культивировании штаммов, последовательно выдерживали в присутствии 0,5 % или 1,0 % желчи при 37°C в течение 6 ч. После этого отбирали аликвоты сuspензий клеток (0,1 мл) для определения КОЕ/мл чашечным способом. Инкубацию посевов проводили при 37°C в течение 48 ч. Для подсчета числа жизнеспособных клеток бактерий использовали среды MRS и LB агар. Контролем служили моновиовые культуры бактерий.

Формирование биопленок бактериальных ассоциаций идентифицировали методом их инкубации в 96-луночных круглодонных планшетах с кристаллическим фиолетовым [21, 22]. После завершения инкубации из лунок планшета удаляли культуральную жидкость, вносили 125 мкл 0,1 %-ного раствора генциан фиолетового и выдерживали в течение 20 мин при комнатной тем-

пературе. Удаление красителя осуществляли путем 5-кратного промывания планшетов дистиллированной водой. В качестве растворителя генциан фиолетового использовали диметилсульфоксид (ДМСО). После его внесения в лунки планшета ДМСО в объеме 150 мкл, отбирали 125 мкл раствора с растворителем и помещали в чистые плоскодонные планшеты. Измерение оптической плотности раствора проводили при длине волны 570 нм. Для оценки эффективности биопленкообразования рассчитывали индекс формирования биопленки (ИФБ) согласно [23].

Статистический анализ результатов проводили с использованием критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони и однофакторного дисперсионного анализа после предварительной оценки выборки на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Обработку данных проводили в программах «Statistica 10» и «Microsoft Excel». Различия считали статистически достоверными при 95 %-ной доверительной вероятности ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение. Формирование бактериальной ассоциации – один из ключевых этапов, определяющий эффективность разрабатываемого поливидового/полиштаммового пробиотика [12]. Анализ биосовместимости бактериальных культур показал, что они не проявляют антагонизма и могут быть использованы для формирования эффективной ассоциации и дальнейших исследований (табл. 1).

Таблица 1. Анализ биосовместимости бактериальных культур*

	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>B. subtilis</i>	3	3	3	2

*1 тип – антагонизм, 2 тип – нейтралитет, 3 тип – синергизм.

Определение устойчивости штаммов исследуемых ассоциаций при инкубации в среде со значениями pH, приближенными к условиям различных отделов пищеварительного тракта птицы, показало способность их бактериальных клеток сохранять жизнеспособность (рис. 1 и 2). При совместном выдерживании исследуемых штаммов в среде с pH 5,0 (зоб) в течение 1 ч количество их жизнеспособных клеток оставалось на уровне контроля (числа бактерий в начале эксперимента). Инкубация штамма *B. subtilis* в среде с pH 3,0 (желудок) в течение 1,5 ч в составе ассоциации № 1 снижала ($p < 0,05$) число его клеток на 27,3 %, ассоциации № 2 – на 30,7 %, ассоциации № 3 – на 31,5 %, ассоциации № 4 – с 48,7 %, по сравнению с

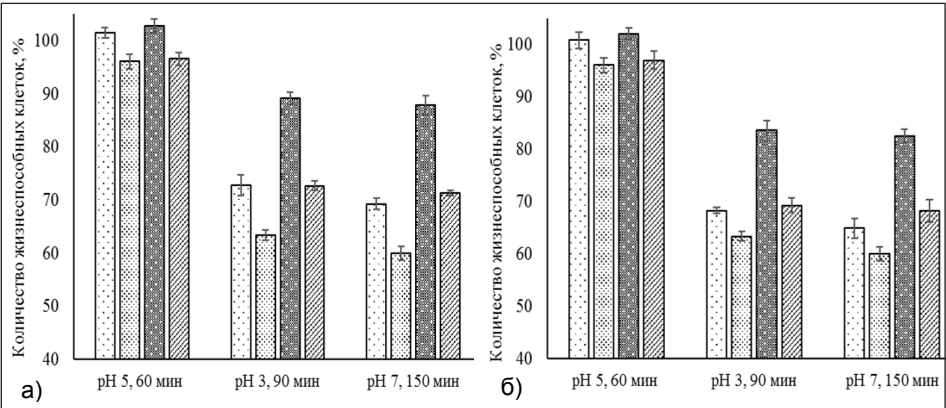


Рис. 1. Устойчивость бактериальных ассоциаций № 1 (а) и № 2 (б) в среде, значения pH которой аналогичны условиям в различных отделах пищеварительного тракта сельскохозяйственных птиц (в вариантах с pH 5,0 различия между количеством жизнеспособных клеток *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. subtilis* в монокультуре и в смешанной культуре статистически не значимы при $p=0,05$), %: а) □ – *L.a.*, □ – *B.s.*, ■ – *L.a. + B.s.*, ▨ – *B.s. + L.a.*; б) □ – *L.p.*, □ – *B.s.*, ■ – *L.p. + B.s.*, ▨ – *B.s. + L.p.*.

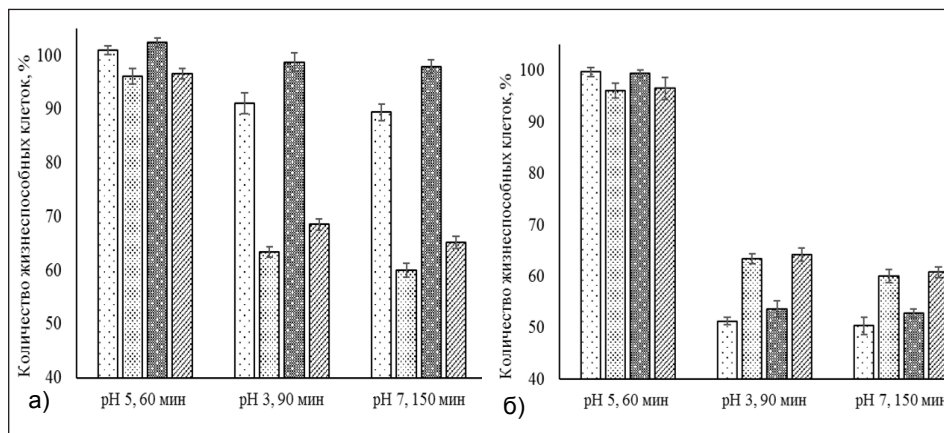


Рис. 2. Устойчивость бактериальных штаммов ассоциаций № 3 (а) и 4 (б) в среде, значения pH которой аналогичны условиям в различных отделах пищеварительного тракта сельскохозяйственных птиц (в варианте с pH 5,0 статистически не значимы при $p=0,05$ различия между количеством жизнеспособных клеток *L. rhamnosus*, *P. acidilactici*, *B. subtilis* в монокультуре и в смешанной культуре; с pH 3,0 и 7,0 – между содержанием жизнеспособных клеток *B. subtilis*), %: а) □ – *L.r.*, ▤ – *B.s.*, ▨ – *L.r.+B.s.*, ▩ – *B.s.+L.r.*; б) □ – *P.a.*, ▤ – *B.s.*, ▨ – *P.a.+B.s.*, ▩ – *B.s.+P.a.*

контролем. Совместное нахождение *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* или *P. acidilactici* в присутствии штамма *B. subtilis* в аналогичных условиях (pH 3,0, 1,5 ч) приводило к уменьшению численности их клеток, по сравнению с контролем, соответственно на 10,8 ($p<0,05$), 16,4 ($p<0,05$), 1,2 ($p>0,05$) и 46,4 ($p<0,05$) %. После совместного инкубирования клеток штамма *B. subtilis* с *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* или *P. acidilactici* при pH 7,0 (кишечник) в течение 2,5 ч наблюдали несущественное снижение ($p<0,05$) их количества до соответственно 71,4, 68,2, 65,2 и 60,8 % от контроля. Выживаемость в аналогичных условиях штаммов *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* или *P. acidilactici* в присутствии *B. subtilis* составила 87,9, 82,5, 97,9 и 52,9 % соответственно относительно контроля.

Инкубирование исследуемых микробных ассоциаций на основе штаммов молочнокислых и спорообразующих бактерий в жидкой модифицированной среде MRS, содержащей 0,5 и 1,0 % желчь цыплят-бройлеров, в течение 6 ч показало их устойчивость к желчи (рис. 3 и 4). В среде с 0,5 % желчи ингибирование ($p<0,05$) роста клеток *L. acidophilus*, *L. plantarum* или *L. rhamnosus* при совместной инкубации со штаммом *B. subtilis* составило соответственно 45,5, 63,9 и 10,3 %, в присутствии 1 % желчи – 75,1, 78,2 и 32,0 % относительно контроля. В результате совместного выдерживания бациллы с указанными молочнокислыми бактериями в среде, содержащей 0,5 % желчь, количество ее жизнеспособных клеток снижалось ($p<0,05$) в среднем до 92...94 %, в среде с 1 % желчью – до 46...49 % относительно контроля. Сравнительно высокая устойчивость к 0,5 и 1 % желчи обнаружена для штамма *P. acidilactici*: количество его клеток в смешанной культуре в среднем достигало 100...101 % от контроля.

1,0 % желчи (выживаемость – 99,2 %). В используемых в нашем исследовании условиях выживаемость клеток монокультуры *P. acidilactici* и ее бактериальной ассоциации (№ 4) находилась практически на одном уровне. Например, после выдерживания клеток монокультуры *P. acidilactici* в среде со значениями pH, приближенными к условиям различных отделов пищеварительного тракта птицы, ее выживаемость составила 50,4 %, а в ассоциации – 52,9 %.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что штаммы *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *P. acidilactici* или *B. subtilis* существенно различаются по проявлению устойчивости к стрессовым факторам [12, 17, 18]. Так, выживаемость штамма *L. rhamnosus* CA15 (DSM 33960) после его выдерживания в среде с низким значением pH (3,0) в течение 120 и 240 мин составляла соответственно 92,0 и 86,0 % относительно контроля [24]. Показана способность этого штамма лактобактерий проявлять более высокую устойчивость к различным концентрациям желчи (при использовании 0,5 и 1,0 % желчи в течение 120 и 240 мин выживаемость – 91,0 и 89,0 % соответственно) [24] в отличие от штамма *L. acidophilus* TISTR1338, выживаемость которого после 60 мин воздействия 0,5 и 1,0 % соли желчи составляла соответственно 79,7 и 42,5 %, по сравнению с контролем [25].

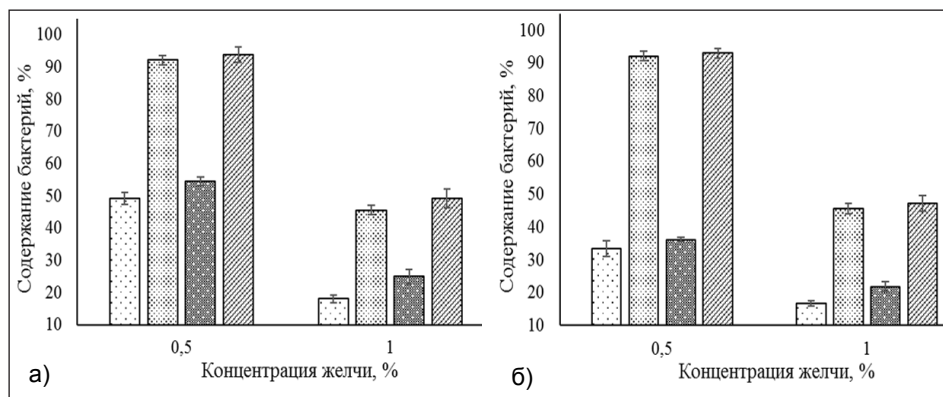


Рис. 3. Устойчивость бактериальных ассоциаций № 1 (а) и 2 (б) к желчи цыплят-бройлеров (в вариантах с 0,5 и 1,0 % желчи различия между количеством бактериальных клеток *B. subtilis* в монокультуре и в смешанных культурах статистически не значимы при $p=0,05$), %: а) □ – *L.a.*, ▤ – *B.s.*, ▨ – *L.a.+B.s.*, ▩ – *B.s.+L.a.*; б) □ – *L.p.*, ▤ – *B.s.*, ▨ – *L.p.+B.s.*, ▩ – *B.s.+L.p.*

Монокультуры *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* и *B. subtilis* также, как и ассоциации на их основе, обладали устойчивостью к широкому диапазону pH среды (см. рис. 1 и 2) и различным концентрациям желчи (см. рис. 3 и 4) цыплят-бройлеров. Их выживаемость при последовательной инкубации в среде с pH 3,0, 5,0 и 7,0 находилась в среднем на уровне 60...89 %, при использовании 1,0 % желчи – 17...64 %. Монокультура *P. acidilactici* характеризовалась наименьшей устойчивостью к pH среды 3,0 (выживаемость составила 51,3 %) и наибольшей – к

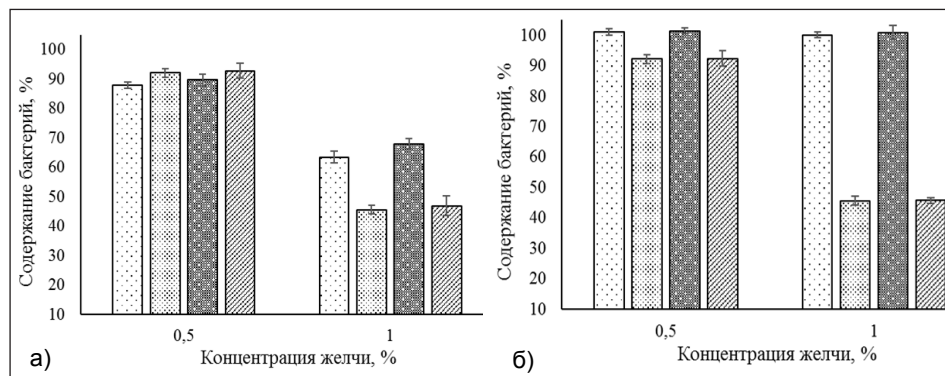


Рис. 4. Устойчивость бактериальных клеток штаммов ассоциаций № 3 (а) и 4 (б) в среде с желчью цыплят-бройлеров (в вариантах с 0,5 и 1,0 % желчи различия между количеством бактериальных клеток *L. rhamnosus*, *P. acidilactici* и *B. subtilis* в монокультуре и в составе ассоциаций статистически не значимы при $p=0,05$), %: а) □ – *L.r.*, ▤ – *B.s.*, ▨ – *L.r.+B.s.*, ▩ – *B.s.+L.r.*; б) □ – *P.a.*, ▤ – *B.s.*, ▨ – *P.a.+B.s.*, ▩ – *B.s.+P.a.*

Содержание желчи 1,0 %, использованное в работе для определения устойчивости исследуемых бактерий и их ассоциаций, было существенно выше, чем установлено при оценке выживаемости штаммов микроорганизмов – потенциальных кандидатов в пробиотики. Чаще ее проводят на средах с содержанием солей желчи 0,1...0,5 % [8, 13].

Полученные результаты согласуются с данными зарубежных авторов, которые показали, что в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения в желудке и кишечнике у млекопитающих, штаммы *Bacillus subtilis* в составе ассоциаций с молочнокислыми микроорганизмами способны повышать выживаемость последних [19, 20]. В наших исследованиях для ассоциаций № 1, 2 и 3 отмечено увеличение устойчивости к различным значениям pH, характерным для отделов пищеварительного тракта птицы (см. рис. 1 и 2), и концентрациям желчи цыплят-бройлеров (см. рис. 3 и 4), по сравнению с соответствующими монокультурами. Наибольшее повышение степени устойчивости к указанным стресс-факторам показала ассоциация микроорганизмов на основе *L. acidophilus* и *B. subtilis*. Так, при использовании pH 3,0 выживаемость этих микроорганизмов в составе ассоциации была соответственно в 1,23 и 1,14 раза выше, в сравнении с величинами аналогичных показателей у монокультур.

Ассоциации № 1, 2 и 3 характеризовались повышенным уровнем образования биопленок, по сравнению с монокультурами (табл. 2). ИФБ для ассоциации № 1, которая отличалась наибольшей способностью формировать биопленку, был равен $1,06 \pm 0,03$, а для монокультур *L. acidophilus* и *B. subtilis* – $0,85 \pm 0,02$ и $0,94 \pm 0,02$ соответственно. При этом ассоциация № 4 образовывала биопленку на том же уровне, что и монокультура *B. subtilis*.

Таблица 2. **Способность бактериальных штаммов ассоциаций формировать смешанные биопленки**

Монокультура/смешанная культура	ИФБ
<i>L. acidophilus</i>	$0,85 \pm 0,02$
<i>L. plantarum</i>	$0,81 \pm 0,01$
<i>L. rhamnosus</i>	$0,90 \pm 0,02$
<i>P. acidilactici</i>	$0,72 \pm 0,01$
<i>B. subtilis</i>	$0,94 \pm 0,02$
<i>L. acidophilus</i> + <i>B. subtilis</i> (ассоциация № 1)	$1,06 \pm 0,03$
<i>L. plantarum</i> + <i>B. subtilis</i> (ассоциация № 2)	$1,00 \pm 0,02$
<i>L. rhamnosus</i> + <i>B. subtilis</i> (ассоциация № 3)	$1,04 \pm 0,02$
<i>P. acidilactici</i> + <i>B. subtilis</i> (ассоциация № 4)	$0,96 \pm 0,02$

Повышенная устойчивость ассоциаций № 1, 2 и 3 к различным значениям pH и концентрациям желчи, по сравнению с монокультурами, по-видимому, в основном обусловлена способностью входящего в их состав штамма *B. subtilis* в модифицированной среде MRS формировать биопленку. В работе зарубежных исследователей показано, что в процессе совместного выращивания *B. subtilis* с молочнокислыми бактериями в схожей по составу питательной

среде при 37 °C в течение 8 ч происходит образование биопленок бациллой [19]. Кроме того, известно, что полимерный матрикс бацилл, на который приходится более 90 % сухой массы их биопленок, способен участвовать в защите от агрессивного воздействия на бактериальную клетку других отличных от исследованных в нашем исследовании стресс-факторов среды [20, 22]. Образующий *B. subtilis* матрикс состоит из поверхностно-активных соединений, нуклеиновых кислот, белков, липидов и, главным образом, экзополисахаридов (EPS), за синтез которых ответственны гены, входящие в *epsA-O* оперон (*eps*) [26, 27].

Способность штамма *B. subtilis* формировать биопленку открывает перспективы для использования внеклеточного полимерного матрикса бациллы в качестве средства доставки жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий с пробиотическими свойствами к органу-мишени для обеспечения наиболее эффективного лечебного эффекта.

Выводы. Бактериальные ассоциации микроорганизмов на основе *L. acidophilus* и *B. subtilis*, *L. plantarum* и *B. subtilis*, *L. rhamnosus* и *B. subtilis*, *P. acidilactici* и *B. subtilis* обладали устойчивостью к желчи (0,5...1,0 %) цыплят-бройлеров и широкому диапазону pH (3,0...7,0), характерному для различных отделов пищеварительного тракта птицы. После совместного выдерживания клеток спорообразующей бактерии с представителями *Lactobacillaceae* при указанных значениях pH их количество в среднем составляло 61...71 %, а молочнокислых бактерий в присутствии бациллы – 53...98 % по сравнению с контролем. В среде с 1,0 % желчи цыплят-бройлеров выживаемость лактобактерий при совместной их инкубации со штаммом *B. subtilis* находилась в среднем на уровне 22...47 %, бациллы в составе ассоциации – 46...49 % относительно контроля.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-26-00161.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящей работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Р. З. Гибадуллину (кафедра таксации и экономики лесной отрасли Ка-

занского государственного аграрного университета), Ш. З. Валидову (НИЛ «Микробные биотехнологии» ИФМиБ Казанского (Приволжского) федерального университета), Т. В. Багаевой (кафедра биохимии,

биотехнологии и фармакологии ИФМиБ Казанского (Приволжского) федерального университета) за помощь и полезные советы в аналитических экспериментах.

Литература.

1. Биопрепараты микробного происхождения в птицеводстве / Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, М. Т. Лутфуллин и др. // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2018. Т. 160. № 3. С. 395–418.
2. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, Г. Ф. Хадиева и др. // Ученые записки Казанского университета. Серия. Естественные науки. 2017. Т. 159. № 1. С. 85–107.
3. Влияние пробиотиков *Bacillus subtilis* GM2 и GM5 на рост и усвояемость кормов у цыплят-бройлеров / Г. Ф. Хадиева, М. Т. Лутфуллин, А. А. Николаева и др. // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2019. Т. 161. № 3. С. 472–489. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.472-489.
4. Оптимизация параметров совместного культивирования *Bacillus subtilis* GA27 и *Bacillus subtilis* RF-45 для возможности создания пробиотиков, метапробиотиков и метабиотиков для птицеводства / Р. С. Мухаммадиев, Р. С. Мухаммадиев, Л. Р. Валиуллин и др. // Ветеринария Кубани. 2023. № 3. С. 32–38. doi: 10.33861/2071-8020-2023-3-32-38.
5. Effect of *Salmonella typhimurium* colonization on microbiota maturation and blood leukocyte populations in broiler chickens / K. Robinson, A. L. F. V. Assumpcao, K. Arsi, et al. // Animals (Basel). 2022. Vol. 12. No. 20. P. 2867–2882. doi: 10.3390/ani12202867.
6. The gut microbiota of chickens in a commercial farm treated with a *Salmonella* phage cocktail / V. Clavijo, T. Morales, M. J. Vives-Flores, et al. // Sci. Rep. 2022. Vol. 12. No. 1. P. 991–1007. doi: 10.1038/s41598-021-04679-6.
7. Выделение, очистка и изучение физикохимических свойств ксиланазы штамма *Bacillus subtilis* 9 / Л. Р. Валиуллин, Р. С. Мухаммадиев, Р. С. Мухаммадиев и др. // Достижения науки и техники АПК. 2021. Т. 35. № 10. С. 66–71. doi: 10.53859/02352451_2021_35_10_66.
8. Новые штаммы *Bacillus subtilis* как перспективные пробиотики / Г. Ф. Хадиева, М. Т. Лутфуллин, Н. К. Мочалова и др. // Микробиология. 2018. Т. 87. № 4. С. 356–365. doi: 10.1134/S0026261718040112.
9. Мерзлякова О. Г., Рогачёв В. А. Использование пробиотиков на основе штаммов рода *Bacillus* в кормлении перепелов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2019. Т. 49. № 2. С. 70–76. doi: 10.26898/0370-8799-2019-2-9.
10. Биопрепарат на основе штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 для животноводства. Сообщение I. Кормление бройлеров / В. И. Фисинин, Е. Н. Андрианова, И. И. Чеботарев и др. // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 2. С. 382–390. doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.382rus.
11. Бактерии – антагонисты возбудителей кишечных инфекций и продуценты комплекса целлюлаз как основа для создания добавок, объединяющих функции пробиотика и кормового фермента / Л. Р. Валиуллин, Риш. С. Мухаммадиев, Рин. С. Мухаммадиев и др. // Достижения науки и техники АПК. 2021. Т. 35. № 9. С. 60–66. doi: 10.53859/02352451_2021_35_9_60.
12. Молочнокислые и спорообразующие бактерии: формирование сообществ как основы функциональных добавок с пробиотическими свойствами для птицеводства / Р. С. Мухаммадиев, Р. С. Мухаммадиев, Л. Р. Валиуллин и др. // Ветеринария Кубани. 2023. № 2. С. 30–36. doi: 10.33861/2071-8020-2023-2-30-36.
13. Новые штаммы *Lactobacillus acidophilus* как перспективные пробиотики для птицеводства / Л. Р. Валиуллин, Риш. С. Мухаммадиев, Рин. С. Мухаммадиев и др. // Ветеринария Кубани. 2022. № 6. С. 16–21. doi: 10.33861/2071-8020-2022-6-16-21.
14. Forssten S. D., Morovic W., Nurminen P. An in vitro model of the chicken gastrointestinal tract with special emphasis to the cecal microbiota // Poult. Sci. 2023. Vol. 102. No. 6. Article 102654. doi: 10.1016/j.psj.2023.102654.
15. Development of a chicken gastrointestinal tract (GIT) simulation model: Impact of cecal inoculum storage preservation conditions / N. M. de Carvalho, C. M. Costa, C. Castro, et al. // Applied Microbiology. 2023. Vol. 3. No. 3. P. 968–992. doi: 10.3390/applmicrobiol3030066.
16. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных / И. В. Дармов, И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский и др. // Журнал инфектологии. 2012. Т. 4. № 1. С. 68–74. doi: 10.22625/2072-6732-2012-4-1-68-74.
17. *Lactobacillus rhamnosus* AD3 as a promising alternative for probiotic products / A. Stivala, G. Carota, V. Fuochi, et al. // Biomolecules. 2021. Vol. 11. No. 1. P. 94–108. doi: 10.3390/biom11010094.
18. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs / X. Guo, D. Li, W. Lu, et al. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2006. Vol. 90. No. 2. P. 139–146. doi: 10.1007/s10482-006-9067-9.
19. Kimelman H., Shemesh M. Probiotic bifunctionality of *Bacillus subtilis* - rescuing lactic acid bacteria from desiccation and antagonizing pathogenic *Staphylococcus aureus* // Microorganisms. 2019. Vol. 7. No. 10. P. 407–423. doi: 10.3390/microorganisms7100407.
20. Encapsulation of beneficial probiotic bacteria in extracellular matrix from biofilm-forming *Bacillus subtilis* / S. Yahav, Z. Berkovich, I. Ostrov, et al. // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2018. Vol. 46. Suppl. 2. P. 974–982. doi: 10.1080/21691401.2018.1476373.
21. Чернова Л. С., Шарафутдинов И. С., Каюмов А. Р. Гиперпродукция белка HtrA повышает выживаемость клеток *Bacillus subtilis* в условиях стресса и стимулирует формирование биопленки // Ученые записки Казанского университета. Серия. Естественные науки. 2017. Т. 159. № 2. С. 262–271.
22. Влияние различных факторов на формирование биопленок бациллами / Г. Р. Ахметова, Н. Л. Рудакова, Т. Л. Динь и др. // Ученые записки Казанского университета. Серия. Естественные науки. 2019. Т. 161. № 3. С. 363–374. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.363-374.
23. Characteristic of co-culture biofilm formed by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*, and antagonistic effects of this biofilm on pathogen growth / T. K. N. Nguyen, H. V. Duong, T. T. Nguyen, et al. // Jpn. J. Food Eng. 2020. Vol. 21. P. 81–87. doi: 10.11301/jse.20564.
24. *Lactobacillus rhamnosus* CA15 (DSM 33960) as a candidate probiotic strain for human health / A. Pino, A. Vaccalluzzo, C. Caggia, et al. // Nutrients. 2022. Vol. 14. No. 22. P. 4902–4921. doi: 10.3390/nu14224902.
25. Thaweessang S., Leenanon B. Survival of *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 in bile salt stress conditions // Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sci. 2016. Vol. 18. No. 3. P. 569–579.
26. Бистабильность и формирование матрикса биопленки как механизмы адаптации *Bacillus subtilis* в стационарной фазе / М. Р. Шарипова, А. М. Марданова, Н. Л. Рудакова и др. // Микробиология. 2021. Т. 90. № 1. С. 24–42.

doi: 10.1134/S002626172006017X.

27. Применение сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии для экспресс-оценки морфологии и химического состава бактериальных пленок при периодическом культивировании / Д. А. Файзуллин, А. В. Кобелев, С. В. Клементьев и др. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. № 3 (42). С. 406–416. doi: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-406-416.

References

1. Feoktistova NV, Mardanov AM, Lutfullin MT, et al. [Microbial preparations in poultry farming]. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki*. 2018;160(3):395-18. Russian.
2. Feoktistova NV, Mardanov AM, Hadieva GF, et al. [Probiotics based on bacteria from the genus *Bacillus* in poultry breeding]. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki*. 2017;159(1):85-107. Russian.
3. Khadieva GF, Lutfullin MT, Nikolaeva AA, et al. [The effect of *Bacillus subtilis* GM2 and GM5 probiotics on the growth and fodder digestibility of broiler chickens]. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki*. 2019;161(3):472-89. Russian. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.472-489.
4. Muhammadiev RS, Muhammadiev RS, Valiullin LR, et al. [Optimization of co-cultivation parameters of *Bacillus subtilis* GA27 and *Bacillus subtilis* RF-45 for possibility of developing probiotics, metaprobiotics, and metabiotics for poultry farming]. *Veterinariya Kubani*. 2023;(3):32-8. Russian. doi: 10.33861/2071-8020-2023-3-32-38.
5. Robinson K, Assumpcao ALFV, Arsi K, et al. Effect of *Salmonella typhimurium* colonization on microbiota maturation and blood leukocyte populations in broiler chickens. *Animals (Basel)*. 2022;12(20):2867-82. doi: 10.3390/ani12202867.
6. Clavijo V, Morales T, Vives-Flores MJ, et al. The gut microbiota of chickens in a commercial farm treated with a *Salmonella* phage cocktail. *Sci. Rep.* 2022;12(1):991-1007. doi: 10.1038/s41598-021-04679-6.
7. Valiullin LR, Muhammadiev RS, Muhammadiev RS, et al. [Isolation, purification, and study of the physicochemical properties of xylanase of the *Bacillus subtilis* 9 strain]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2021;35(10):66-71. Russian. doi: 10.53859/02352451_2021_35_10_66.
8. Khadieva GF, Lutfullin MT, Mochalova NK, et al. [New *Bacillus subtilis* strains as promising probiotics]. *Mikrobiologiya*. 2018;87(4):356-65. Russian. doi: 10.1134/S0026261718040112.
9. Merzlyakova OG, Rogachyov VA. [The use of probiotics based on strains of the genus *Bacillus* in quail feeding]. *Sibirskij vestnik sel'skhozayajstvennoj nauki*. 2019;49(2):70-6. Russian. doi: 10.26898/0370-8799-2019-2-9.
10. Fisinin VI, Andrianova EN, Chebotarev II, et al. [Dietary probiotic *Lactobacillus plantarum* L-211 for farm animals. I. The additive for broiler chicks (*Gallus gallus* L.)]. *Sel'skhozayajstvennaya biologiya*. 2017;52(2):382-90. Russian. doi: 10.15389/agrobiologiya.2017.2.382rus.
11. Valiullin LR, Mukhammadiev RishS, Mukhammadiev RinS, et al. [Antagonistic bacteria of pathogens of intestinal infections and producers of a complex of cellulases as a basis for creating additives that combine the functions of a probiotic and a feed enzyme]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2021;35(9):60-6. Russian. doi: 10.53859/02352451_2021_35_9_60.
12. Muhammadiev RS, Muhammadiev RS, Valiullin LR, et al. [Lactic acid and sporing bacteria: formation of consortiums as the basis of functional supplements with probiotic properties for poultry farming]. *Veterinariya Kubani*. 2023;(2):30-6. Russian. doi: 10.33861/2071-8020-2023-2-30-36.
13. Valiullin LR, Mukhammadiev RS, Mukhammadiev RS, et al. [New *Lactobacillus acidophilus* strains as promising probiotics for poultry farming]. *Veterinariya Kubani*. 2022;(6):16-1. Russian. doi: 10.33861/2071-8020-2022-6-16-21.
14. Forssten SD, Morovic W, Nurminen P. An in vitro model of the chicken gastrointestinal tract with special emphasis to the cecal microbiota. *Poult. Sci.* 2023;102(6): Article 102654. doi: 10.1016/j.psj.2023.102654.
15. De Carvalho NM, Costa CM, Castro C, et al. Development of a chicken gastrointestinal tract (GIT) simulation model: Impact of cecal inoculum storage preservation conditions. *Applied Microbiology*. 2023;3(3):968-92. doi: 10.3390/applmicrobiol3030066.
16. Darmov IV, Chicherin IYu, Pogorel'skij IP. [Survival of probiotic microorganisms in the gastrointestinal tract of experimental animals]. *Zhurnal infektologii*. 2012;4(1):68-74. Russian. doi: 10.22625/2072-6732-2012-4-1-68-74.
17. Stivala A, Carota G, Fuochi V, et al. *Lactobacillus rhamnosus* AD3 as a promising alternative for probiotic products. *Biomolecules*. 2021;11(1):94-108. doi: 10.3390/biom11010094.
18. Guo X, Li D, Lu W, et al. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;90(2):139-46. doi: 10.1007/s10482-006-9067-9.
19. Kimelman H, Shemesh M. Probiotic bifunctionality of *Bacillus subtilis* - rescuing lactic acid bacteria from desiccation and antagonizing pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*. 2019;7(10):407-23. doi: 10.3390/microorganisms7100407.
20. Yahav S, Berkovich Z, Ostrov I, et al. Encapsulation of beneficial probiotic bacteria in extracellular matrix from biofilm-forming *Bacillus subtilis*. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018;46 Suppl 2:974-82. doi: 10.1080/21691401.2018.1476373.
21. Chernova LS, Sharafutdinov IS, Kayumov AR. [HtrA protein hyperproduction increases the viability of *Bacillus subtilis* cells under the stress conditions and stimulates biofilm formation]. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki*. 2017;159(2):262-71. Russian.
22. Ahmetova GR, Rudakova NL, Din' TL, et al. [The role of various factors in the process of biofilm formation by bacilli]. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki*. 2019;161(3):363-74. Russian. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.363-374.21.
23. Nguyen TKN, Duong HV, Nguyen TT, et al. Characteristic of co-culture biofilm formed by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*, and antagonistic effects of this biofilm on pathogen growth. *Jpn. J. Food Eng.* 2020;21:81-7. doi: 10.11301/jsfe.20564.
24. Pino A, Vaccaluzzo A, Caggia C, et al. *Lactobacillus rhamnosus* CA15 (DSM 33960) as a candidate probiotic strain for human health. *Nutrients*. 2022;14(22):4902-21. doi: 10.3390/nu14224902.
25. Thaweesang S, Leenanon B. Survival of *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 in bile salt stress conditions. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* 2016;18(3):569-79.
26. Sharipova MR, Mardanov AM, Rudakova NL, et al. [Bistability and formation of the biofilm matrix as adaptive mechanisms during the stationary phase of *Bacillus subtilis*]. *Mikrobiologiya*. 2021;90(1):24-2. Russian. doi: 10.1134/S002626172006017X.
27. Fajzullin DA, Kobleev AV, Klement'ev SV, et al. [Application of scanning electron microscopy and IR spectroscopy for a timely evaluation of the morphology and chemical composition of bacterial films during batch cultivation]. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya himiya i biotekhnologiya*. 2022;12(3):406-16. Russian. doi: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-406-416.

Поступила в редакцию 12.04.2024 После доработки 02.05.2024 Принята к публикации 04.06.2024