



УДК 579.61

DOI:10.31677/2311-0651-2024-43-1-78-86

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В.В. Домнышева, аспирант

Д.А. Домнышев, кандидат технических наук

Ю.А. Гуляева, кандидат химических наук

А.Н. Швыдков, доктор сельскохозяйственных наук

А.И. Калмыкова, доктор биологических наук, профессор

Новосибирский государственный аграрный университет

E-mail: v.domnysheva@yandex.ru

Ключевые слова: лактобактерии, бифидобактерии, метаболиты, метабиотик, антагонистическая активность, биоплёнкообразование.

Реферат. В научном сообществе в настоящее время предметом интереса и изучения являются метабиотики – новое поколение пробиотиков на основе биологически активных компонентов (метаболитов). Это более совершенная и перспективная форма пробиотических препаратов, среди свойств которой особо отмечаются высокая биодоступность, безопасность и универсальность в применении. В статье представлено исследование антагонистической активности и биоплёнкообразования условно-патогенных штаммов микроорганизмов под действием метаболитов пробиотических микроорганизмов, выращенных на различных питательных средах и находящихся в различном физическом состоянии. Задачи, поставленные в ходе исследования, отвечают на вопросы о биологической активности пробиотических микроорганизмов, выращенных на различных питательных средах и находящихся в различном физическом состоянии. Полученные данные лягут в основу дальнейшего исследования активных компонентов, позволяющих получать клинический эффект, а также помогут сформировать подход к разработке наиболее эффективных готовых форм метабиотиков. Место проведения исследований – микробиологическая лаборатория Испытательного центра Испытательного лабораторного комплекса ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROBIOTIC MICROORGANISMS DEPENDING ON CULTIVATION CONDITIONS

V.V. Domnysheva, PhD Student

D.A. Domnyshev, PhD in Technical Sciences

Y.A. Gulyaeva, PhD in Chemical Sciences

A.N. Shvydkov, Doctor of Agricultural Sciences

A.I. Kalmykova, Doctor of Biological Sciences, Professor

Novosibirsk State Agrarian University

Keywords: lactobacillus, bifidobacterium, metabolites, metabiotic, antagonistic activity, biofilm formation.

Abstract. *Metabiotics, a new generation of probiotics based on biologically active components (metabolites), are currently the subject of interest and study in the scientific community. This is a more advanced and promising form of probiotic preparations, among the properties of which high bioavailability, safety, and versatility in use are especially noted. The article presents a study of the antagonistic activity and biofilm formation of opportunistic strains of microorganisms under the influence of metabolites of probiotic microorganisms grown on various nutrient media and in different physical states. The objectives posed during the study answer questions about the biological activity of probiotic microorganisms grown on different nutrient media and in various physical states. The data obtained will form the basis for further research of active components that allow obtaining a clinical effect and will also help formulate an approach to developing the most effective ready-made forms of metabiotics. The place of research is the microbiological laboratory of the Testing Center of the Testing Laboratory Complex of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Novosibirsk State Agrarian University.*

Известно, что состав питательной среды оказывает большое влияние как на скорость роста, так и на синтез биологически активных соединений или других метаболитов у различных микроорганизмов. Исследования показывают, что на разных питательных средах отличаются как концентрация, так и состав метаболитов пробиотических микроорганизмов, что отражается на биологической активности нативного раствора [1, 2].

Целью исследования является изучение биологической активности метаболитов пробиотических микроорганизмов при разных условиях культивирования и формах выпуска готового продукта.

Задачи, которые решаются в рамках темы исследования, отвечают на вопросы о биологической активности пробиотических микроорганизмов, выращенных на различных питательных средах и находящихся в различном физическом состоянии.

В качестве объектов исследования биологической активности метаболитов пробиотических микроорганизмов выступали штаммы лакто- и бифидобактерий: *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 и *Bifidobacterium longum* MC-42 в различных формах выпуска [3].

В представленной работе пробиотические микроорганизмы выращивали на промышленных средах, белковой составляющей которых являлся молочный и растительный (соевый) белок.

Концентрация микроорганизмов после определенного времени культивирования отличалась, но в исследовании мы использовали культуральную жидкость и нативный раствор микроорганизмов, выращенных на разных питательных средах за один и тот же промежуток времени.

Для бифидобактерий время культивирования составило 16 ч, для лактобактерий – 13 ч.

Как видно из табл. 1, и для бифидо-, и для лактобактерий характерна корреляция между титром и кислотностью – при более низком титре отмечается меньшая кислотность нативного раствора. При этом бифидобактерии быстрее растут на соевой среде, а лактобактерии дают более высокий титр и кислотность при росте на молочной среде. Кислотность продукта определяется в большей степени молочной кислотой, которая в определенной степени проявляет антагонистические свойства.

Таблица 1

Концентрация микроорганизмов и кислотность полученного нативного раствора
The concentration of microorganisms and acidity of the resulting native solution

Показатель	<i>B. longum</i> MC-42		<i>L. plantarum</i> 8P-A3	
	Молочный белок	Соевый белок	Молочный белок	Соевый белок
Титр, КОЕ/мл	$3 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^9$
Титруемая кислотность, °Т	48	56	76	72

Однако большую активность в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов проявляют бактериоцины, которые могут быть как экстра-, так и эндоцеллюлярными. Именно поэтому в нашу работу были включены исследования по биологической активности культуральной жидкости пробиотических микроорганизмов, в которых микробные клетки были лизированы с помощью протеолитических ферментов. Как показали предыдущие исследования, проведенные нами, ферментолиз микробных клеток является максимально щадящим для метаболитов и при этом разрушение клеток составляет не менее 90 %.

Еще один дискуссионный вопрос – биологическая активность высушенных про- и метабитиков. Известно, что метабитики пока не получили широкого распространения и находятся на стадии активных исследований как в отечественных институтах, так в зарубежных, но сама концепция стремительно набирает обороты, поэтому метаболиты пробиотических микроорганизмов на современном этапе очень мало изучены [4, 5]. И если за антагонистическую активность отвечают кислоты и бактериоцины пептидной природы, то действующие вещества, способствующие снижению образования биопленок, не известны [6]. Поэтому мы не можем гарантировать, что эти вещества окажутся активными при воздействии на них крайне низких температур, используемых при сублимационной сушке. По этой причине в наши задачи входило исследовать и сравнить биологическую активность сухих метаболитов.

Как тест-культуры для исследования биологической активности раствора метаболитов пробиотических микроорганизмов использовались 4 группы условно-патогенных микроорганизмов, способных вызывать заболевания: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 6380.

Антагонистическую активность нативного раствора определяли при соинкубировании тест-культур на мясопептонном бульоне (МПБ). Для этого к МПБ добавляли нативный раствор исследуемых штаммов в концентрациях 30, 20 и 13 % к конечному объему. В пробу добавляли тест-культуру в количестве $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Инкубировали пробы при температуре $37,5 \pm 0,5$ °C в течение 24 ч. После каждую пробу высевали на селективные питательные среды для определения роста тест-культуры.

Элективной средой для *E. coli* ATCC 25922 служила среда Эндо – положительный результат определяли по наличию колоний красного цвета с зеленоватым металлическим блеском. Среда для *P. aeruginosa* ATCC 27853 – мясопептонный агар (МПА). Положительный результат определяли по характерному пигменту сине-зеленого цвета, который культура выделяет в питательную среду после культивирования. Диагностическая среда для *St. aureus* ATCC 25953 – агаризованная среда Байрд-Паркера, на которой золотистый стафилококк образует характерные колонии с черным пигментом и зоны вокруг колонии, образующиеся в результате липолиза и протеолиза. Для определения роста *Pr. vulgaris* ATCC 6380 использовали метод Щукевича. Для этого в нижний угол скошенного МПА добавляли 0,1 мл соинкубированной культуры. Наличие роста протей определяли по восходящему росту культуры. Пробы на плотных элективных питательных средах термостатировали при температуре 37 °C в течение 24 ч, культуры стафилококка *St. aureus* ATCC 25953 – 48 ч.

По наличию роста судили о наличии или отсутствии антагонистической активности. При 100 %-м антагонизме роста культур после соинкубирования не наблюдали. При наличии слабого роста (число колоний от 2 до 6 на чашке) антагонистическая активность высокая, но меньше 100 %. При массивном росте культуры на чашке Петри антагонистическая активность отсутствует [7 – 9].

Антагонистическая активность метаболитов изучаемых пробиотических микроорганизмов, выращенных на различных питательных средах, представлена в табл. 2 и 3. Сравнение антагонистической активности в данном случае проводили в исходном – нативном растворе.

Таблица 2

Наличие роста тест-культуры после соинкубирования с *L. plantarum* 8P-A3 на различных питательных средах
Presence of test culture growth after co-incubation with *L. plantarum* 8P-A3 on various nutrient media

Штамм	Концентрация нативного раствора, %	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pr. vulgaris</i>
<i>L. plantarum</i> 8P-A3 молочная среда	30	-	-	-	-
	20	-	-	-	+
	13	-	-	+	+
<i>L. plantarum</i> 8P-A3 соевая среда	30	-	-	-	-
	20	-	-	+	+
	13	-	+	+	+

Как видно из табл. 2, метаболиты исследуемых лактобактерий в концентрации 30 % при совместном инкубировании с условно-патогенными и патогенными тест-культурами полностью прекращают рост последних независимо от питательной среды. При концентрации метаболитов 20 и 13 % полностью ингибируется рост кишечной палочки и в большей степени золотистого стафилококка. Его рост наблюдается только в случае соинкубирования с 13 %-м раствором метаболитов лактобактерий, выращенных на среде с соевым белком. *P. aeruginosa* и *Pr. vulgaris* оказываются резистентными к 13- и 20 %-й концентрации метаболитов лактобактерий, выращенных на обеих питательных средах.

При анализе антагонистической активности метаболитов бифидобактерий также наблюдается высокая антагонистическая активность по отношению к тест-культурам. При этом метаболиты бифидобактерий, выращенных на питательной среде с соевым белком, обладают более выраженной антагонистической активностью, чем лактобактерии и бифидобактерии, выращенные на среде с молочным белком.

Таблица 3

Наличие роста тест-культуры после соинкубирования с *B. longum* МС-42 на средах с разным источником белка
Presence of test culture growth after co-incubation with *B. longum* MS-42 on media with different protein sources

Штамм	Концентрация нативного раствора, %	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pr. vulgaris</i>
<i>B. longum</i> МС-42 молочная среда	30	+	-	-	-
	20	+	-	-	+
	13	+	-	+	+
<i>B. longum</i> МС-42 соевая среда	30	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
	13	-	-	+	+

Обращает на себя внимание тот факт, что рост кишечной палочки отсутствовал при совместном культивировании с метаболитами бифидобактерий, выращенных на питательной

среде с соевым белком во всех концентрациях, в то время как метаболиты бифидобактерий, выращенных на молочной питательной среде, не оказывали на *E. coli* никакого влияния.

Таким образом, активность метаболитов лактобактерий в отношении тест-культур патогенных и условно-патогенных микроорганизмов не зависела от состава питательной среды, а для бифидобактерий оптимальной является питательная среда с добавлением соевого белка как источника азота. В дальнейшей работе по исследованию антагонистической активности мы ориентируемся на метаболиты бифидобактерий, выращенных на соевой среде.

Зависимость антагонистической активности от различных способов обработки культуральной жидкости и раствора метаболитов представлена в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Наличие роста тест-культуры после соинкубирования с различными формами раствора метаболитов *B. longum* MC-42

Presence of test culture growth after co-incubation with various forms of *B. longum* MC-42 metabolite solution

Штамм	Концентрация нативного раствора, %	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pr. vulgaris</i>
<i>B. longum</i> MC-42 жидкий	30	-	-	-	-
	20	-	-	-	+
	13	-	-	+	+
<i>B. longum</i> MC-42 ферментированный	30	-	-	-	-
	20	+	-	+	+
	13	+	+	+	+
<i>B. longum</i> MC-42 сухой	30	+	-	+	-
	20	+	-	+	+
	13	+	+	+	+

Согласно табл. 4, при внесении метаболитов *B. longum* с концентрацией 30 % в нативной жидкой, а также ферментированной форме наблюдается полное ингибирование роста всех исследуемых штаммов. При понижении концентрации до 20 % в образцах с ферментированной формой задержка роста наблюдается исключительно у *St. aureus*, а при концентрации 13 % рост и вовсе отмечен у всех тест-культур. В жидкой форме, напротив, при понижении концентрации метаболитов полностью сохраняется антагонистическая активность в отношении к *E. coli*, *St. aureus*, а также *P. aeruginosa* – рост данной культуры появляется только при снижении концентрации метаболитов до 13 %. Против *Pr. vulgaris* эффективной концентрацией в жидкой форме остаётся только 30 %.

Что касается сухой формы, большинство тест-культур остаются резистентными к разным концентрациям метаболитов бифидобактерий; отмечается ингибирование *St. aureus* и *Pr. vulgaris* только при самой высокой концентрации.

Похожая ситуация наблюдается и в случае с метаболитами лактобактерий (см. табл. 5). Наивысшую антагонистическую активность показывают метаболиты в жидкой форме при самой высокой концентрации – 30 %. Стоит отметить, что это единственный случай, когда наблюдается полное отсутствие роста *Pr. vulgaris*, так как во всех прочих пробах он показывает резистентность к изменению концентрации и форме выпуска нативного раствора лактобактерий.

Таблица 5

Наличие роста тест-культуры после соинкубирования с различными формами раствора метаболитов *L. plantarum* 8P-A3

Presence of test culture growth after co-incubation with various forms of *L. plantarum* 8P-A3 metabolite solution

Наименование штамма	Концентрация нативного раствора, %	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pr. vulgaris</i>
<i>L. plantarum</i> 8P-A3 жидкий	30	-	-	-	-
	20	-	-	-	+
	13	-	-+	+	+
<i>L. plantarum</i> 8P-A3 ферментированный	30	-	-	+	+
	20	+	-	+	+
	13	+	-+	+	+
<i>L. plantarum</i> 8P-A3 сухой	30	+	-	+	+
	20	+	-	+	+
	13	+	-	+	+

Таким образом, как видно из обеих таблиц, самую высокую степень антагонистической активности по отношению к условно-патогенным микроорганизмам показывают метаболиты *B. longum* и *L. plantarum* в жидкой форме. В концентрации 30 % наблюдается полное отсутствие роста условно-патогенных микроорганизмов в обоих случаях. На основании полученных данных отмечаем, что антагонистическая активность зависит от концентрации метаболитов, добавленных в МПБ при соинкубировании: внесение 30 % приводит к 100 %-й гибели тест-культур у бифидобактерий и молочнокислых микроорганизмов в жидкой форме. Снижение концентрации раствора метаболитов до 20 % приводит к снижению антагонистической активности в отношении ГР- микроорганизмов, чаще *Pr. vulgaris* и в единичных случаях – *Ps. aeruginosa*. При внесении 13 % метаболитов в питательную среду 100 %-я гибель тест-культур достигается только в отношении отдельных условно-патогенных микроорганизмов, чаще всего ГР+ *Staph. aureus*.

Наименее эффективными можно считать метаболиты в сухой форме: динамика при разных концентрациях метаболитов практически полностью отсутствует как у *L. plantarum*, так и у *B. longum*.

Так как максимальное снижение антагонистической активности показано для сухих образцов, дальнейшие исследования по образованию биопленок мы проводили только с нативными образцами.

Способность образовывать биопленку патогенными микроорганизмами является одним из факторов их вирулентности. Поэтому возможность снижения биопленкообразующей активности метаболитами пробиотических бактерий является одной из задач при разработке состава метаболитного пробиотика [10].

Образование биоплёнок изучалось с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночной полистироловой поверхности стерильного планшета.

Биоплёнкообразование тест-культур под действием пробиотических метаболитов лакто- и бифидобактерий на питательных средах с разным источником белка показано в табл. 6.

Наиболее эффективными против образования биопленок УМП являются метаболиты бифидобактерий на соевой питательной среде: в данном случае снижение биоплёнкообразования (БПО) каждой культуры составляет 50 % и более. Самый высокий показатель отмечен у *E. coli* – её биоплёнкообразующая способность была снижена на 79,4 %.

Таблица 6

Биоплёнкообразование тест-культур под действием пробиотических метаболитов
Biofilm formation of test cultures under the influence of probiotic metabolites

Показатель	Контроль	<i>B. longum</i> МС-42 молочная среда	<i>B. longum</i> МС-42 соевая среда	<i>L. plantarum</i> 8P-A3 молочная среда	<i>L. plantarum</i> 8P-A3 соевая среда
<i>E. coli</i>	0,637±0,010	0,260±0,010	0,192±0,010	0,499±0,010	0,508±0,010
% снижения		59,18	79,40	11,60	11,20
<i>St. aureus</i>	0,501±0,010	0,202±0,010	0,190±0,010	0,306±0,010	0,301±0,010
% снижения		59,60	62,00	38,80	39,03
<i>Pr. vulgaris</i>	0,603±0,010	0,245±0,010	0,223±0,010	0,369±0,020	0,362±0,010
% снижения		61,30	63,10	38,80	40,09
<i>Ps. aeruginosa</i>	0,616±0,020	0,271±0,010	0,301±0,010	0,356±0,010	0,351±0,010
% снижения		56,01	51,06	42,21	43,19
Среднее		59,0225	63,89	32,8525	33,3775

У бифидобактерий на молочной среде общий показатель снижения БПО также выше 50 %, хоть и не достигает таких значений, как на соевой. Эффективность снижения БПО на молочной среде в случае *Ps. aeruginosa* даже выше, чем на соевой (56 % против 51), однако у остальных тест-культур она меньше.

В случае с *L. plantarum* средняя степень снижения БПО на разных питательных средах меньше, чем у бифидобактерий (32 – 33 %). Не замечено различий в способности ингибировать БПО в зависимости от используемого источника белка.

Высокая способность бифидобактерий снижать способность условно-патогенных микроорганизмов образовывать биопленку подтверждает основную задачу микроорганизмов вида *B. longum* – способность осуществлять микробное распознавание ассоциативных микросимбионтов и прямую защиту биотопа от патогенов [11 – 12].

БПО считается важным фактором вирулентности, в связи с чем по существенному снижению ее у тест-культур можно судить о том, что метаболиты, полученные из бифидобактерий, выращенных на соевой среде, более эффективны против условно-патогенных микроорганизмов [13 – 14].

Таким образом, в ходе практического анализа установлено, что метаболиты пробиотических культур *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 и *Bifidobacterium longum* МС-42 обладают антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 6380.

Максимально высокую антагонистическую активность по отношению к условно-патогенным штаммам показывают метаболиты *B. longum* МС-42, полученные на соевой среде.

Способность образовывать биопленку наиболее эффективно снижают метаболиты бифидобактерий, выращенных на соевой среде. Эффективность у *L. plantarum* 8P-A3 снижена по сравнению с *B. longum* МС-42 на 30 %.

Биологическая активность метаболитов, проявляющаяся в антагонистической активности и снижении биопленкообразования, максимально выражена в нативной жидкой форме. Лиофильная сушка и ферментализ существенно снижают биологическую активность метаболитов [15].

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – Т. 3. – С. 6–11.
2. Потапов А.С., Пахомовская Н.Л., Полякова С.И. Применение пробиотиков врачами общей практики // *Consilium medicum*. Гастроэнтерология. – 2007. – № 1. – С. 54–58.
3. Воробьев А.А., Лыкова Е.А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции // Микробиология. – 1999. – Т. 6. – С. 102–105.
4. Ардатская М.Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микробиологических нарушений кишечника // Медицинский совет. – 2015. – № 13. – С. 94–99.
5. Сафонова М.А., Кузнецов О.Ю. Пробиотические препараты для коррекции микробиологических нарушений кишечника // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2012. – Т. 17, № 1. – С. 49–53.
6. Тюрин М.В., Шендеров Б.А., Рахимова Н.Г. [и др.] К механизму антагонистической активности лактобацилл // Журнал микробиологии. – 1989. – Т. 2. – С. 3–8.
7. Калмыкова А.И., Селятицкая В.Г., Пальчикова Н.А., Бгатова Н.П. Клеточные и системные механизмы действия пробиотиков. – Новосибирск, 2007. – 280 с.
8. Несчисляев В.А. Пробиотики: микробиологические и технологические аспекты получения, контроля и конструирования препаратов: дис. ... д-ра мед. наук. – Пермь, 2005. – 277 с.
9. Приложение 7 к техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) [Электронный ресурс] – URL: <https://www.expert-test.ru/stati/prilozhenie-7-k-tekhnicheskomu-reglamentu-tamozhennogo-soyuza-o-bezopasnosti-pishchevoj-produktsii-tr-ts-021-2011> (дата обращения: 01.10.2023).
10. Лазарев С.А., Михайлова Н.А. Действие метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* на биопленкообразование условно-патогенных бактерий // Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2020. – С. 57–59.
11. Иванова Е.В. Роль бифидофлоры в ассоциативном симбиозе кишечной микробиоты человека: дис. ... д-ра мед. наук. – Оренбург, 2018. – 295 с.
12. Скворцов В.В., Бессонов А.А., Кузнецова Е.В., Емельянов Д.Н. Современные подходы в коррекции микробиома кишечника // Лекарственный вестник. – 2019. – Т. 13, № 2 (74). – С. 38–43.
13. Шендеров Б.А., Ткаченко Е.И., Лазебник Л.Б. [и др.] Метабиотики – новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микробиологическими нарушениями в организме человека // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – № 3 (151). – С. 83–92.
14. Федорова Т.В. Технологические аспекты разработки поликомпонентного пробиотика на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий: дис. ... канд. фарм. наук. – Пермь, 2017. – 128 с.
15. Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П., Микельсаар М.Э., Тюрин М.Э. Лактофлора и колонизационная резистентность // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Т. 32, № 3. – С. 173–179.

REFERENCES

1. Darmov I.V., Chicherin I.Yu., Pogorel'skij I.P., Lundovskih I.A., *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*, 2011, Vol. 3, pp. 6–11. (In Russ.)
2. Potapov A.S., Pahomovskaya N.L., Polyakova S.I., *Consilium medicum. Gastroenterologiya*, 2007, No. 1, pp. 54–58. (In Russ.)
3. Vorob'ev A.A., Lykova E.A., *Mikrobiologiya*, 1999, Vol. 6, pp. 102–105. (In Russ.)
4. Ardatkaya M.D. *Medicinskij sovet*, 2015, No. 13, pp. 94–99. (In Russ.)
5. Safonova M.A., Kuznecov O.Yu., *Vestnik Ivanovskoj medicinskoj akademii*, 2012, Vol. 17, No. 1, pp. 49–53. (In Russ.)
6. Tyurin M.V., Shenderov B.A., Rahimova N.G. [i dr.], *Zhurnal mikrobiologii*, 1989, Vol. 2, pp. 3–8. (In Russ.)

7. Kalmykova A.I., Selyatickaya V.G., Pal'chikova N.A., Bgatova N.P. *Kletochnye i sistemnye mekhanizmy dejstviya probiotikov* (Cellular and systemic mechanisms of action of probiotics.), Novosibirsk, 2007, 280 p.
8. Neschislyayev V.A. *Probiotiki: mikrobiologicheskie i tekhnologicheskie aspekty polucheniya, kontrolya i konstruirovaniya preparatov* (Probiotics: Microbiological and Technological Aspects of Preparation, Control and Design of Preparations), Dissertation of Doctor of Medical Sciences, Perm, 2005, 277 p. (In Russ.)
9. *Prilozhenie 7 k tekhnicheskomu reglamentu Tamozhennogo soyuza "O bezopasnosti pishchevoj produkcii" TR TS 021/2011*, available at: <https://www.expert-test.ru/stati/prilozhenie-7-k-tekhnicheskomu-reglamentu-tamozhennogo-soyuza-o-bezopasnosti-pishchevoj-produktsii-tr-ts-021-2011> (October 1, 2023).
10. Lazarev S.A., Mihajlova N.A., *Biotekhnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya*, 2020, pp. 57–59. (In Russ.)
11. Ivanova E.V. *Rol' bifidoflory v associativnom simbioze kishechnoj mirobioty cheloveka* (The Role of Bifidoflora in the Associative Symbiosis of the Human Intestinal Myrobiota), Dissertation of a Doctor of Medical Sciences Orenburg, 2018, 295 p. (In Russ.)
12. Skvorcov V.V., Bessonov A.A., Kuznecova E.V., Emel'yanov D.N., *Lekarstvennyj vestnik*, 2019, Vol. 13, No. 2 (74), pp. 38–43. (In Russ.)
13. Shenderov B.A., Tkachenko E.I., Lazebnik L.B. [i dr.], *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*, 2018, No. 3 (151), pp. 83–92. (In Russ.)
14. Fedorova T.V. *Tekhnologicheskie aspekty razrabotki polikomponentnogo probiotika na osnove metabolitov proizvodstvennyh shtammov lakto-i bifidobakterij* (Technological Aspects of the Development of a Multicomponent Probiotic Based on Metabolites of Production Strains of Lactobacilli and Bifidobacteria), Doctor's thesis Pharmacological Sciences, Perm, 2017, 128 p. (In Russ.)
15. Lencner A.A., Lencner H.P., Mikel'saar M.E., Tyuri M.E., *Antibiotiki i medicinskaya biotekhnologiya*, 1987, Vol. 32, No. 3, pp. 173–179. (In Russ.)