

Выделение психрофильных микроорганизмов из природных источников Кемеровской области и изучение их антимикробных свойств

Л. С. Дышлюк¹, О. О. Бабич¹, Л. А. Остроумов¹, Сяоцзе Ван²,
С. Ю. Носкова¹, С. А. Сухих^{1,*}



¹ Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

Дата поступления в редакцию: 08.11.2020
Дата принятия в печать: 25.12.2020

² Цицикарский университет, Цицикар, Китай

*e-mail: stas-asp@mail.ru



© Л. С. Дышлюк, О. О. Бабич, Л. А. Остроумов, Сяоцзе Ван, С. Ю. Носкова, С. А. Сухих, 2020

Аннотация.

Введение. В настоящее время экстремальные психрофилы мало изучены. Однако они представляют интерес для создания биопрепаратов для производства лекарств и повышения сроков хранения пищевых продуктов. Проблема исследования свойств психрофильных микроорганизмов является актуальной. Целью работы является выделение в экстремальных условиях низких температур пещер Горной Шории и Салаира (Кемеровская область) новых психрофильных микроорганизмов и изучение их антимикробных свойств.

Объекты и методы исследования. Психрофильные микроорганизмы, выделенные в пещерах Кемеровской области. Образцы помещали в стерильную крафтовую бумагу. Устойчивость к антибиотикам определялась областью, в которой диск с антибиотиком подавлял рост изолята. Для этого выделенную суспензию клеток инокулировали сплошным газоном в чашке Петри со средой на основе агар, а диски с антибиотиками помещали на поверхность среды. Инкубировали в термостате при 28 °С в течение 24 ч.

Результаты и их обсуждение. Из микробных сообществ пещер Гавриловская и Азаская выделено 7 изолятов, различных по морфологическим признакам. Установлено, что изоляты 1, 4 и 5 обладают выраженными супрессивными свойствами по отношению ко всем тест-культурам патогенов при температуре 2 ± 4 °С. Изоляты 1, 4 и 5 устойчивы к различным антибиотикам. Изолят 1 проявляет высокую устойчивость (21–26) к антибиотикам неомицину и новограму. Среднюю устойчивость (17–22) – к цепаину, канамицину, левомицитину, карбенициллину и стрептомицину. Низкую устойчивость (2–8) – к антибиотикам бензилпенициллину и клотримазолу. Изолят 1 не проявляет антибиотикоустойчивость к ампициллину, гентамицину и тетрациклину. Изолят 4 проявляет высокую устойчивость (22–27) к новограму. Среднюю устойчивость (10–22) – к тетрациклину, клотримазолу, неомицину, цепаину, канамицину, левомицитину и мономицину. Низкую устойчивость (2–8) – к антибиотикам ампициллину, бензилпенициллину, стрептомицину и гентамицину. Изолят 4 не проявляет антибиотикоустойчивость к карбенициллину и полимиксину. Изолят 5 высоко устойчив (27–26) к антибиотикам цепаину, бензилпенициллину, левомицитину и новограму. Средне устойчив (12–22) к клотримазолу, стрептомицину, неомицину, гентамицину, полимиксину, карбенициллину и мономицину. Изолят 5 не устойчив к ампициллину, тетрациклину и канамицину.

Выводы. Психрофилы могут выступать в роли микроорганизмов, на основе которых будет создаваться новые биопрепараты, подавляющие развитие заболеваний у растений. Использование психрофилов в процессе выращивания и хранения продукции сельского хозяйства является перспективным и актуальным научным направлением.

Ключевые слова. Психрофильные микроорганизмы, изоляты, бактериоцины, антимикробные свойства

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (№ 20-34-70004\19 от 21.11.2019 г).

Для цитирования: Выделение психрофильных микроорганизмов из природных источников Кемеровской области и изучение их антимикробных свойств / Л. С. Дышлюк, О. О. Бабич, Л. А. Остроумов [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 4. – С. 763–773. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-763-773>.

Original article

Available online at <http://fptt.ru/eng>

Psychrophilic Microorganisms in Natural Sources of the Kemerovo Region: Isolation and Antimicrobial Properties

Lyubov S. Dyshlyuk¹, Olga O. Babich¹, Lev A. Ostroumov¹, Xiaojie Wang²,
Svetlana Yu. Noskova¹, Stanislav A. Sukhikh^{1,*}



Abstract.

Introduction. Extreme psychrophiles still remain largely understudied. However, they can serve as biological components in drug production, as well as increase the shelf life of food products in food industry. Therefore, the properties of psychrophilic microorganisms are a relevant study object. The present research objective was to isolate new psychrophilic microorganisms in extreme low-temperature conditions of the caves of Gornaya Shoria and Salair (Kemerovo region) and study their antimicrobial properties.

Study objects and methods. The research featured psychrophilic microorganisms isolated in the caves of the Kemerovo region. The sampling was performed in triplicate. The samples were placed in sterile paper. Antibiotic resistance was defined according to the area where the antibiotic plate suppressed bacterial growth. The cell suspension was placed in a Petri dish with an agar-based medium. The discs with antibiotics were put on the surface of the medium and incubated in a thermostat at 28°C for 24 h in order to describe the growth of the isolates.

Results and discussion. The microbial communities of the Gavrilovskaya and Azasskaya caves produced seven isolates with different morphological characteristics. Isolates 1, 4, and 5 had pronounced suppressive properties at $2 \pm 4^\circ\text{C}$. Isolates 1, 4, and 5 proved resistant to antibiotics. Isolate 1 exhibited high resistance (21–26) to Neomycin and Novogramon, medium resistance (17–22) to Ceparin, Kanamycin, Levomycin, Carbenicillin, and Streptomycin, and low (2–8) resistance to Benzylpenicillin and Clotrimazole. Isolate 1 had no antibiotic resistance to Ampicillin, Gentamicin, and Tetracycline. Isolate 4 showed high resistance (22–27) to Novogramon, medium resistance (10–22) to Tetracycline, Clotrimazole, Neomycin, Zeparin, Kanamycin, Levomycin, and Monomycin, and low resistance (2–8) to Ampicillin, Benzylpenicillin, Streptomycin, and Gentamicin. Isolate 4 demonstrated no antibiotic resistance to Carbenicillin and Polymyxin. Isolate 5 proved highly resistant (27–26) to Ceparin, Benzylpenicillin, Levomycin, and Novogramon, and medium resistant (12–22) to Clotrimazole, Streptomycin, Neomycin, Gentamicin, Polymyxin, Carbenicillin, and Monomycin. Isolate 5 demonstrated no resistance to Ampicillin, Tetracycline, and Kanamycin.

Conclusion. Psychrophiles can serve as microorganisms to create new biological products that suppress the development of diseases in plants. Psychrophiles proved an extremely promising research direction for cultivating and storing agricultural products.

Keywords. Psychrophilic microorganisms, isolates, bacteriocins, antimicrobial properties

Funding. The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR)^{ROR} (No. 20-34-70004\19 dated November 21, 2019).

For citation: Dyshlyuk LS, Babich OO, Ostroumov LA, Wang X, Noskova SYu, Sukhikh SA. Psychrophilic Microorganisms in Natural Sources of the Kemerovo Region: Isolation and Antimicrobial Properties. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(4):763–773. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-763-773>.

Введение

На сегодняшний день из-за постоянных выбросов в атмосферу загрязняющих веществ наблюдается резкое повышение допустимых концентраций вредных соединений. Появление новых видов болезней и паразитов влияет на то, что производители сельскохозяйственной продукции вынуждены применять новые средства защиты, которые негативно сказываются на безопасности почвы и водоемов. Все это приводит к тому, что с каждым годом появляется все больше препаратов, где химические соединения заменяются микроорганизмами. Однако такие биопрепараты не всегда оказываются эффективными, поэтому поиск и выделение новых штаммов с высокой антагонистической активностью является актуальной задачей.

Использование бактерий с антагонистической активностью является в процессе выращивания и хранения продукции сельского хозяйства перспективным и актуальным научным направле-

нием. С целью предотвращения порчи продукции в процессе хранения от деятельности нежелательной микрофлоры сегодня используют химические препараты, облучение, обработка газом или озоном. Однако данные способы, хоть и являются эффективными, имеют свои недостатки [1].

Из-за постоянного применения химических реагентов у патогенов растет устойчивость к их воздействию, при этом ежегодно появляются новые вспышки заболеваний. Это приводит к повышению вносимых доз препаратов, что способствуют развитию устойчивости патогенов.

В пищевом производстве безопасные консерванты ассоциируются с молочнокислыми бактериями и их метаболитами (бактериоцинами), безопасность которых уже не требует доказательства [2, 3].

Бактериоциноподобные вещества вырабатывают и другие микроорганизмы. Например, бактерии группы *Bacillus* spp., в сочетании с лактобактериями, позволяют расширить спектр антимикробной активности с сохранением относительной безо-

пасности. Но и в этом случае не удастся достичь полной защиты продуктов от действия патогенных бактерий [4].

В условиях пониженных температур решить эту проблему с сохранением безопасности могут психрофильные микроорганизмы. Это не только бактерии, но грибы и дрожжи, оказывающие антагонистический эффект на те микроорганизмы, которые остаются нечувствительными к бактериоцинам молочнокислых бактерий.

Психрофильные бактерии – это бактерии, которые способны выживать при низких температурах (от $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Также психрофилы функционируют при температурах выше $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [5]. На их основе можно создавать новые биопрепараты, подавляющие развитие заболеваний у растений даже при невысоких температурах [6].

Развитие психрофильных микроорганизмов на поверхности пищевых продуктов может способствовать их порче даже при низких температурах. Похожая ситуация может возникнуть с патогенными бактериями, некоторые из которых обладают способностью расти на холоде [7].

В природе психрофильные микроорганизмы могут встречаться как в виде прокариот, так и эукариот. К психрофилам относятся некоторые насекомые, грибы, определенные группы бактерий. В широком смысле, психрофилы – это организмы, не прекращающие свое размножение в условиях низких температур [8, 9].

Психрофильные микроорганизмы целенаправленно воздействуют на возбудителей заболеваний, не наносят экологического вреда и сохраняют все полезные свойства продукции. Помимо предотвращения развития патогенной микрофлоры, при взаимодействии с продуктом микроорганизмы активируют защитные процессы самого продукта. За счет этого у него вырабатывается собственный иммунитет к фитопатогенам [10].

Пещеры на протяжении тысячи лет занимают территории земного ландшафта. Это часть неживой природы с особым ландшафтом, в недрах которых можно найти специфические и встречающиеся только там живые организмы. Фауна пещеры подразделяется на два вида: троглофилы – организмы, помимо пещеры, живущие на наземной части; троглобионты – организмы, обитающие в пещере постоянно. Большое количество представителей троглобионтов обусловлено поддержанием постоянных климатических условий в пещере [11].

К сожалению, пещерам, как и другим составляющим земного ландшафта, наносится непоправимый вред от деятельности человека. Любое стороннее воздействие на пещеры приводит к ее разрушению без возможности восстановления [12].

Если рассматривать микробную флору пещеры, то ее представителями можно считать грибы

и бактерии, которые находятся на различных этапах приспособления к условиям с пониженной температурой. Так как пещера – ограниченное пространство, то это приводит к тому, что микроорганизмы находятся в постоянной борьбе за источники питательной среды. Также микробным представителям пещер необходимо конкурировать с представителями микрофлоры почвы, которые поступают в пещеру с верхних слоев и уже адаптированы к росту при установившихся условиях среды. Такая борьба привела к тому, что в пещере можно встретить штаммы микроорганизмов с антимикробной активностью, направленной на подавление роста представителей наземных бактерий. Данные микроорганизмы можно применять для защиты растений от нежелательной микрофлоры и болезней даже при условиях низких температур, где известные биопрепараты не будут приносить должного эффекта [4, 13].

После изучения пещерной микробиоты Сибирского региона обнаружено наличие в них трех представителей микроорганизмов:

– облигатно психрофильные микроорганизмы (морские светящиеся бактерии, *Bacillus psychrophilus*, железобактерии). Для данных представителей оптимальной температурой для роста и развития является диапазон между $+15\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$. При температуре, выходящей за установленные рамки, микроорганизмы теряют способность к дальнейшему развитию и погибают. Облигатно психрофильные микроорганизмы относятся к постоянным обитателям пещер и хорошо адаптированы к сибирским условиям;

– факультативные микроорганизмы (бактерии рода *Arthrobacter*, *Pseudomonas*). Представители данного микробного сообщества имеют оптимальную температуру роста $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$. При этом не теряют такую способность при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Они относятся к микроорганизмам, которые попадают в пещеры извне. Возможность расти при невысоких температурах позволяет им полностью адаптироваться к пещерной среде и образовать свою микробиоту [12, 13];

– психротолерантные изоляты, которые включают в себя температурный диапазон роста, находящийся в промежуточных пределах между облигатно психрофильными и мезофильными микроорганизмами. Психротолерантные изоляты можно рассматривать как переходную форму между психрофилами и мезофилами, которые отличаются друг от друга выживаемостью в определенных температурных условиях [4, 14, 15].

Главной отличительной особенностью изолятов является способность запасаться липоидами. Например, известен штамм психрофила DL-3.2, выделенный из ледяной пещеры, может накапливать до 60 % жиров. Схожие свойства обнаружены и у изолятов, выделенных из других пещер [5].

Психрофильные микроорганизмы отличаются от мезофильных высокой скоростью роста при пониженных температурах (ниже +10 °С). В свою очередь, факультативные психрофилы размножаются более низкими темпами, чем облигатные. Наиболее заметны различия в росте психрофильных и мезофильных бактерий в диапазоне температур от 0 до +10 °С. У мезофилов такие температурные условия замедляют обмен веществ, что приводит к остановке деления клетки [16, 17].

Известны также экстремальные психрофильные микроорганизмы. Они растут в специальных расщелинах, образующихся между водой и льдом, при температуре –10 °С [18].

Было установлено, что почвенные психрофилы, по сравнению с морскими, имеют широкий температурный предел, позволяющий им расти в экстремальных условиях [2, 19].

Реакцией на воздействие низких температур является выделение белков холодного шока (CSP белков). Изначально, белки синтезируются в небольшом количестве, но в дальнейшем, существуя в условиях низких температур, их концентрация значительно увеличивается. CSP белки достаточно активны и способны уменьшать скорость протекания реакции. Для психрофилов источником сохранения энергии выступают ферменты, которые ускоряют реакционные процессы. При последующем понижении температуры в клетках бактерий начинают появляться кусочки льда, что приводит к их гибели. Когда в клетке начинает образовываться лед, то вокруг нее собирается большое количество соли. За счет этого увеличивается осмотическое давление клетки и она приспосабливается к осмотическому шоку. Все это приводит к образованию в клетке осморегуляторных веществ, которые предотвращают клеточные компоненты от разрушения. Известны бактерии (*Pseudomonas syringae*) с центром кристаллизации льда, находящимся в мембранных белках, контролирующее появление частичек льда. Структура образующегося таким образом льда упорядочена и клетка в меньшей степени подвергается разрушению [5, 16, 19].

Психрофилы не образуют единой или несколько филогенетических групп. Из выделенных и охарактеризованных психротрофных микроорганизмов со схожими свойствами большинство относятся к бактериям. Бактерии также достаточно разнообразны: грамтрицательные и грамположительные бактерии, кокки, спорообразующие бактерии и др. [5, 13].

Классификация пещерной микрофлоры Сибирского региона достаточно объемна. Грибы, найденные в данной среде, подразделяются на 15 родов, которые относятся к 5 отделам: *Fusarium*, *Mortierella*, *Doratomyces*, р.р. *Pythium*, *Cryptococcus*, *Echinobotryum*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Penicillium*,

Thamnidium, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Periconia*, *Verticillium*.

Среди обитающих в пещерах психрофильных и психротолерантных бактерий идентифицированы представители коринебактерий, а также род *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Pseudochrobastrum*. Температура, при которой микроорганизмы не теряют способности размножению, может составлять от +23 до +30 °С [9, 16].

Исследования микробиоты пещер и регионов с критическими условиями среды ведутся довольно давно. Уже были достигнуты определенные результаты в данной области. Но данные о функциональном состоянии и генетическом разнообразии пока не структурированы и требуют всестороннего изучения. Психрофилы, хоть и являются перспективным средством для развития экономики и экологии, не являются хорошо изученными. Это говорит о необходимости проведения новых исследований по данному направлению [8, 12].

Целью работы является выделение в экстремальных условиях низких температур пещер Горной Шории и Салаира (Кемеровская область) новых психрофильных микроорганизмов и изучение их антимикробных свойств.

Научная новизна работы заключается в том, что новые психрофильные микроорганизмы были впервые выделены в экстремальных условиях пещер Горной Шории и Салаира и проведены исследования по изучению их антимикробных свойств.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовались психрофильные микроорганизмы, выделенные в пещерах Горной Шории и Салаира (Кемеровская область).

При выполнении исследований использовали антибиотики: новограмон, стрептомицин, полимиксин, карбенициллин, канамицин, неомицин, цепадин, клотримазол, ампициллин, мономицин, левомицитин, тетрациклин, бензилпенициллин и гентамицин.

Микроорганизмы штаммов: *Candida lambica*, *Streptococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Esherihia* sp. и *Salmonella* sp.

При выполнении исследований использовали следующее оборудование: автоклав «DGM-80» («DGM», Швейцария), аналитические весы «AND HR-202i» (A&D, Япония), ламинарный бокс класс 2/тип А («ламинарные системы», Россия); бидистиллятор «ТХ 25-11.15.92-81 БС.W39» (ОАО «Химлабприбор», Россия).

Пробы отбирали трехкратно, в шахматном порядке, на определенной глубине. Образцы помещали в стерильную крафтовую бумагу. Для

Таблица 1. Морфология изолятов, выделенных из пещер Горной Шории и Салаира

Table 1. Morphology of isolates from the Gornaya Shoria and Salair caves

Изолят	Морфология колоний	Микроскопические характеристики
Изолят 1	Колонии диаметром 1–3 мм, цвет колоний светло-желтый со слабо выраженной пигментацией. Колонии круглые, края колоний ровные и плоские, колонии прозрачные	Грамотрицательные палочки $0,5 \pm 0,7 \times 1,0 \pm 2,5$ мкм. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны
Изолят 2	Мелкоморщинистые, округлые, средних размеров (3–5 мм), профиль волнистый, матовые, цвет белый, край волнистый, структура однородная, консистенция плотная	Дрожжеподобные грибки. Клетки крупные, овальные, размером 3,6–7,2 микрона в длину и 3–4,5 микрона в диаметре. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны
Изолят 3	Округлые, размер 6–9 мм, профиль выпуклый, ворсинистые, цвет от белого до буро-зеленого, край неровный, структура неоднородная, консистенция плотная	Активно развитый мицелий. Споро и конидиеобразующие. Грамположительные
Изолят 4	Серовато-белые колонии с гладкими краями, слегка растающими в агар, вязкой консистенции. Размер колоний 1–3 мм	Грамположительные аэробные спорообразующие палочки размером $2-3 \times 0,6$ мкм, расположенные одиночно, попарно или цепочкой. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны
Изолят 5	Колонии в центральной части повышенные, бороздчатые, серовато-белые, бледно-розовые, от серовато-зеленых до орехово-зеленых	Дрожжеподобные грибки. Мицелий светлый, пушистый. Конидиогенез слабый, серо-зеленоватого оттенка
Изолят 6	Мелкоморщинистые, округлые, больших размеров (3–7 мм), профиль волнистый, матовые, цвет от белого до кремового, край неровный, структура однородная, консистенция плотная	Кокки, диплококки, цепочки или скопления из кокков, иногда встречаются палочки. Грамположительные, спорообразующие. Неподвижные. Размер 1–5 мкм
Изолят 7	Серовато-белые колонии с гладкими краями, слегка растающими в агар, вязкой консистенции. Размер 1–3 мм	Грамположительные аэробные спорообразующие палочки размером $2-3 \times 0,6$ мкм, расположенные одиночно, попарно. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны

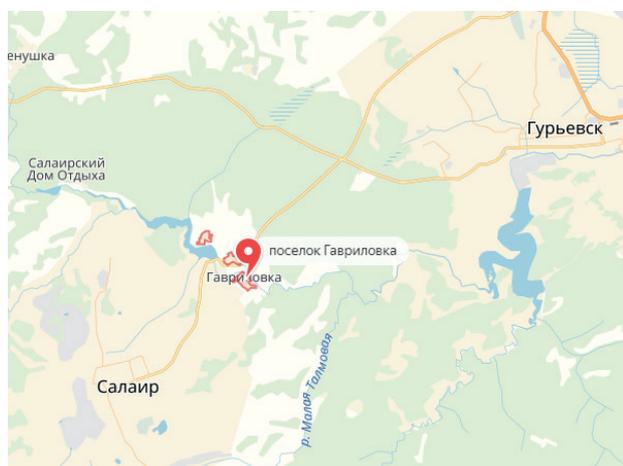


Рисунок 1. Расположение пещеры «Гавриловская» в Кемеровской области

Figure 1. Gavrilovskaya cave in the Kemerovo region

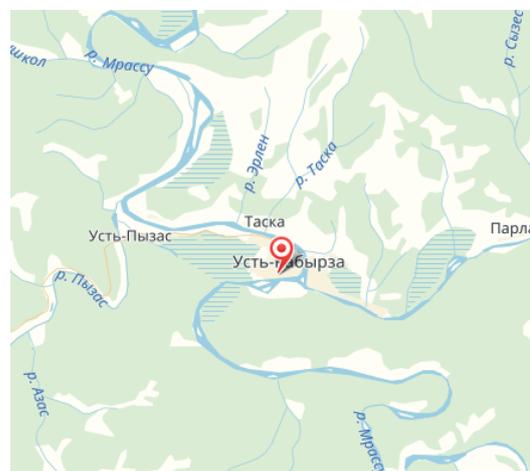


Рисунок 2. Расположение пещеры «Азасская» в Кемеровской области

Figure 2. Azasskaya cave in the Kemerovo region

выделения штаммов использовали метод, описанный в «Методах микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 24.12.2004 № ФЦ/4022), а также Практикумом по биологии почв под редакцией Г. М. Зеновой.

Бактериальные культуры микроорганизмов выращивали на твердой питательной среде следующего состава в течение 48 часов:

- GRM агар, г/л: кислый гидролизат рыбной муки – 20,0; глюкоза – 10,0; агар – 5,0;
- мясопептонный агар (МПА), г/л: пептон сухой



Рисунок 3. Места отбора проб в пещере «Гавриловская»

Figure 3. Sampling locations in Gavrilovskaya cave



Рисунок 4. Места отбора проб в пещере «Азасская»

Figure 4. Sampling locations in Azasskaya cave

ферментативный – 10,0; экстракт мясной – 11,0; NaCl – 5,0; агар-агар – 15,0, глюкоза – 10,0; вода дистиллированная.

Для идентификации выделенных микроорганизмов использовали бактериальные детерминанты Берги и метод, предложенный в монографии О. А. Нестеренко с соавторами. Мазок окрашивали по Граму

Изоляты микроорганизмов получали следующим образом: для выделения ДНК из анализируемых образцов использовался метод экстракции фенолом/хлороформом и очистки раствором СТАВ (цетилтриметил аммонийбромид). Морфологический состав изолятов представлен в таблице 1.

Использовали стандартные методы микробиологии, Enterotest, Nefermtest, API 50 CH и дополнительные каталоги/программы идентификации для биохимического тестирования, а также

бактериологический полуавтоматический анализатор («Autoscan», США) для идентификации изолятов.

Для оценки супрессивной активности изолятов использовали тест-штаммы возбудителей болезней человека, животных и растений. Штаммы родов *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Esheria*, *Candida* и *Acinetobacter*.

Все штаммы-патогены получены из коллекции ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (ГосНИИГенетика)» и Бактериологической лаборатории при МУЗ ЦРБ Гурьевского района.

Чтобы идентифицировать активные изоляты психротрофных бактерий, изоляты наносили на чашки Петри. Параллельно готовили суспензии антагонистических штаммов и патогенных бактерий плотностью не более 10^8 КОЕ/мл. Для

Таблица 2. Исследование психрофильных и супрессивных свойств изолятов, полученных из пещер Горной Шории и Салаира

Table 2. Psychrophilic and suppressive properties of isolates obtained from the caves of Gornaya Shoria and Salair

Номер изолята	Вид микроорганизма						
	<i>Candida lambica</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Esheria</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
	1	2	3	4	5	6	7
Изолят 1	+++	++	+	+	++++	+	++
Изолят 2	–	+	+	–	–	–	–
Изолят 3	–	+	–	–	–	++	–
Изолят 4	+++	+	++++	++	+	++	+
Изолят 5	–	–	++	++	++	+	–
Изолят 6	–	+	+	–	–	–	–
Изолят 7	–	+	+	–	–	+	–

«–» – отсутствие зон; + наличие зоны угнетения роста патогена в месте соприкосновения с бактериальным штрихом; ++ обширная зона угнетения роста патогена в месте соприкосновения с бактериальным штрихом и в сопредельной области; +++ наличие зоны лизиса между штаммами; ++++ наличие обширной зоны лизиса между штаммами.

“–” – no zones; + a zone of inhibition where pathogen comes in touch with the bacterial streak; ++ an extensive zone of inhibition where pathogen comes in touch with the bacterial streak and in the adjacent area; +++ a lysis zone between strains; ++++ an extensive lysis zone between strains.

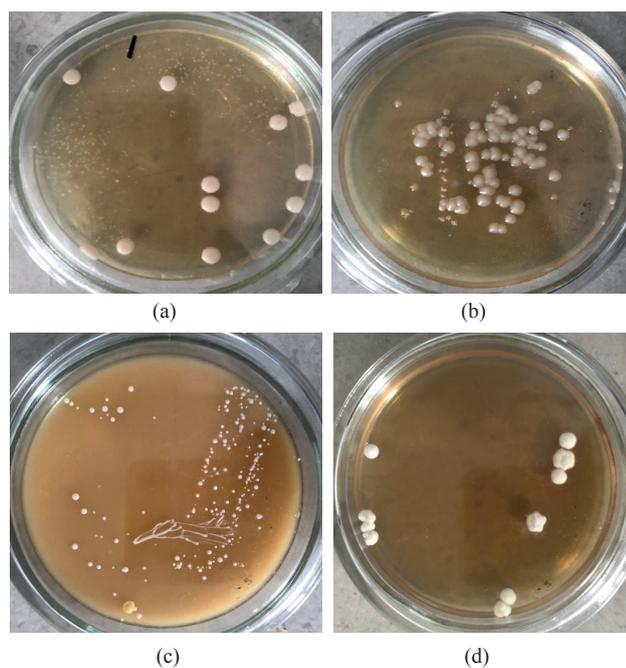


Рисунок 5. Колонии изолятов на ГРМ-агаре через 24 ч культивирования

Figure 5. Colonies of isolates on agar after 24 h of cultivation

получения желаемых клеток бактериальной газон промывали 0,9 % раствором NaCl. Суспензию фитопатогенных грибов готовили промыванием мицелия и массы спор с грибных газонов на картофельном агаре с декстрозой (КНА). В чашку Петри с GRM, мясопептонным агаром (МРА) и КНА инокулировали штаммы-антагонисты по диаметру линии. Инокулировали суспензию бактериальной и

Таблица 3. Результаты изучения антибиотикоустойчивости изолята 1

Table 3. Isolate 1: antibiotic resistance

Антибиотик	Содержание микроорганизмов в 1 см ³ культуры штамма		
	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸
Зоны ингибирования роста изолятов, мм			
Ампициллин	0	0	0
Стрептомицин	12	14	17
Гентамицин	0	0	0
Карбенициллин	19	21	20
Полимиксин	0	0	0
Левомецитин	21	21	19
Клотримазол	6	8	6
Цепарин	20	19	17
Тетрациклин	0	0	0
Мономицин	3	2	2
Неомицин	26	26	24
Новограмон	25	23	26
Канамицин	22	19	17
Бензилпенициллин	2	3	2

грибковой культур перпендикулярно линии. Чашки Петри хранили в холодильнике при 4 °С. Наличие зон подавления роста патогенов оценивали через 8 дней.

Устойчивость к антибиотикам определялась областью, в которой диск с антибиотиком подавлял рост изолята. Для этого выделенную суспензию клеток инокулировали сплошным газонем в чашке Петри со средой на основе агара, а диски с антибиотиками помещали на поверхность среды. Инкубировали в термостате при 28 °С в течение 24 ч. Описывали рост изолятов.

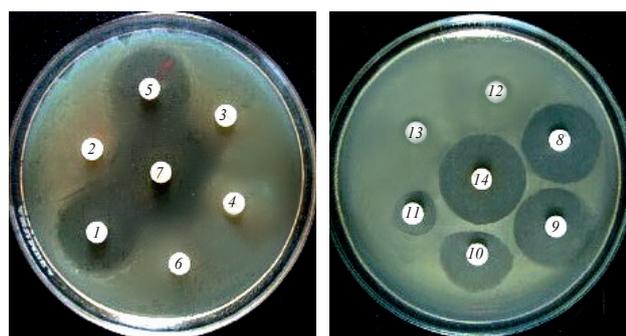


Рисунок 6. Ингибирование зон роста изолята 1:

- 1 – цепагин; 2 – ампициллин; 3 – полимиксин; 4 – гентамицин; 5 – канамицин; 6 – тетрациклин; 7 – неомицин; 8 – левомецитин; 9 – карбенициллин; 10 – стрептомицин; 11 – клотримазол; 12 – бензилпенициллин; 13 – мономицин; 14 – новограмон

Figure 6. Inhibition of growth zones of isolate 1: 1 – Ceparin; 2 – Ampicillin; 3 – Polymyxin; 4 – Gentamicin; 5 – Kanamycin; 6 – Tetracycline; 7 – Neomycin; 8 – Levomycetin; 9 – Carbenicillin; 10 – Streptomycin; 11 – Clotrimazole; 12 – Benzylpenicillin; 13 – Monomycin; 14 – Novogram

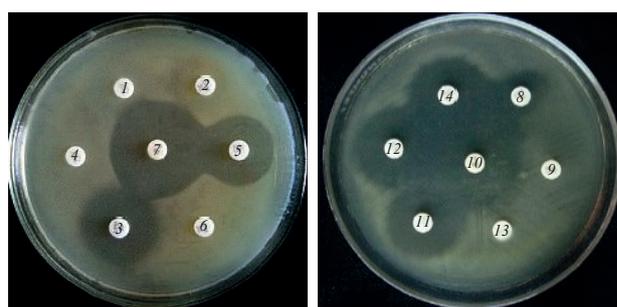


Рисунок 7. Ингибирование зон роста изолята 4:

- 1 – полимиксин; 2 – ампициллин; 3 – тетрациклин; 4 – гентамицин; 5 – клотримазол; 6 – карбенициллин; 7 – новограмон; 8 – мономицин; 9 – стрептомицин; 10 – бензилпенициллин; 11 – неомицин; 12 – цепагин; 13 – канамицин; 14 – левомецитин

Figure 7. Inhibition of growth zones of isolate 4: 1 – Polymyxin; 2 – Ampicillin; 3 – Tetracycline; 4 – Gentamicin; 5 – Clotrimazole; 6 – Carbenicillin; 7 – Novogram; 8 – Monomycin; 9 – Streptomycin; 10 – Benzylpenicillin; 11 – Neomycin; 12 – Zeparin; 13 – Kanamycin; 14 – Levomycetin

Таблица 4. Результаты изучения антибиотикоустойчивости изолята 4

Table 4. Isolate 4: antibiotic resistance

Антибиотик	Содержание микроорганизмов в 1 см ³ культуры штамма		
	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸
	Зоны ингибирования роста изолятов, мм		
Новограмон	22	27	25
Стрептомицин	1	1	2
Полимиксин	0	0	0
Карбенициллин	0	0	0
Канамицин	13	17	16
Неомицин	13	12	11
Цепарин	18	20	22
Клотримазол	10	11	12
Ампициллин	1	2	6
Мономицин	11	12	10
Левомецитин	20	18	18
Тетрациклин	13	13	14
Бензилпенициллин	8	6	8
Гентамицин	1	1	2

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований из микробных сообществ пещер Гавриловская (Кемеровская область, Беловский район, рис. 1, 3) и Азасская (Кемеровская область, Таштагольский район, п. Усть-Кабырза, рис. 2 и 4) выделено 7 изолятов, различных по морфологическим признакам.

Для выделенных изолятов исследовали супрессивные и психрофильные свойства. Полученные результаты представлены в таблице 2.

На основании анализа данных, представленных в таблице 1, установлено, что изоляты 1, 4 и 5 обладают выраженными супрессивными свойствами по отношению ко всем изученным тест-культурам патогенов при температуре 2 ± 4 °С. Дальнейшие исследования свойств изолятов целесообразно проводить с номерами 1, 4 и 5 (рис. 5).

Результаты изучения антибиотикорезистентности выделенных изолятов представлены в таблицах 3–5 и на рисунках 6–8.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изолят 1 проявляет высокую устойчивость (21–26) к антибиотикам неомицину и новограмону. Среднюю устойчивость (17–22) – к цепарину, канамицину, левомецитину, карбенициллину и стрептомицину. Низкую устойчивость (2–8) – к бензилпенициллину и клотримазолу. Изолят 1 не проявляет антибиотикоустойчивость к ампициллину, гентамицину и тетрациклину.

Изолят 4 проявляет высокую устойчивость (22–27) к новограмону. Среднюю устойчивость (10–22) к антибиотикам тетрациклину, клотримазолу, неомицину, цепарину, канамицину, левомецитину и мономицину. Низкую устойчивость (2–8) к

Таблица 5. Результаты изучения антибиотикоустойчивости изолята 5

Table 5. Isolate 5: antibiotic resistance

Антибиотик	Содержание бактерий в 1 см ³ культуры штамма		
	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸
	Зоны ингибирования роста изолятов, мм		
Канамицин	0	0	0
Бензилпенициллин	26	23	27
Цепарин	24	22	27
Полимиксин	12	17	15
Тетрациклин	0	0	0
Стрептомицин	21	20	22
Клотримазол	21	21	22
Левомецитин	27	22	22
Гентамицин	14	17	12
Ампициллин	0	0	0
Неомицин	13	17	16
Мономицин	12	17	12
Карбенициллин	22	20	22
Новограмон	23	26	27

антибиотикам ампициллину, бензилпенициллину, стрептомицину и гентамицину. Изолят 4 не проявляет антибиотикоустойчивость к карбенициллину и полимиксину.

Изолят 5 высоко устойчив (27–26) к антибиотикам цепарину, бензилпенициллину, левомецитину и новограмону. Средне устойчив (12–22) к клотримазолу, стрептомицину, неомицину, гентамицину, полимиксину, карбенициллину и мономицину. Изолят 5 не устойчив к ампициллину, тетрациклину и канамицину.

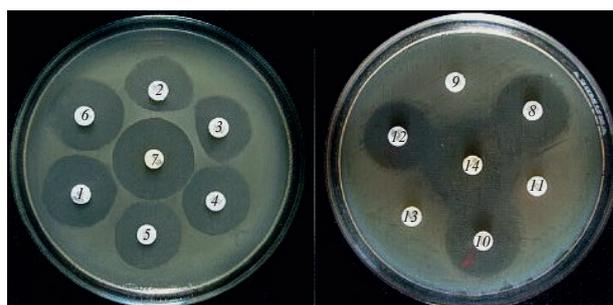


Рисунок 8. Ингибирование зон роста изолята 5:

- 1 – цепарин; 2 – гентамицин; 3 – полимиксин;
 4 – карбенициллин; 5 – мономицин; 6 – новограмон;
 7 – бензилпенициллин; 8 – клотримазол; 9 – тетрациклин;
 10 – стрептомицин; 11 – канамицин; 12 – неомицин;
 13 – ампициллин; 14 – левомецитин

Figure 8. Inhibition of growth zones of isolate 5: 1 – Ceparin; 2 – Gentamicin; 3 – Polymyxin; 4 – Carbenicillin; 5 – Monomycin; 6 – Novogram; 7 – Benzylpenicillin; 8 – Clotrimazole; 9 – Tetracycline; 10 – Streptomycin; 11 – Kanamycin; 12 – Neomycin; 13 – Ampicillin; 14 – Levomycetin

Выводы

Из микробных сообществ пещер Гавриловская (Кемеровская область, Беловский район) и Азасская (Кемеровская область, Таштагольский район, п. Усть-Кабырза) выделено 7 изолятов, различных по морфологическим признакам. Установлено, что наиболее выраженными супрессивными свойствами по отношению к тест-культурам патогенов (*Candida lambica*, *Streptococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Esherihia* sp., *Salmonella* sp.) обладают изоляты 1, 4 и 5. Установлены пределы антибиотикоустойчивости изолятов психрофильных микроорганизмов.

Критерии авторства

Фактический вклад каждого автора:
Л. С. Дышлюк – 25 %, О. О. Бабич – 25 %, Л. А. Остроумов – 15 %, Сяоцзе Ван – 5 %, С. Ю. Носкова – 5 %, С. А. Сухих – 25 %.

Л. А. Остроумов – 15 %, Сяоцзе Ван – 5 %, С. Ю. Носкова – 5 %, С. А. Сухих – 25 %.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Contribution

Each of the authors is responsible for the following part of research: L.S. Dyshlyuk – 25%, O.O. Babich – 25%, L.A. Ostroumov – 15%, Xiaojie Wang – 5%, S.Yu. Noskova – 5%, S.A. Sukhikh – 25%.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Study of biocompatibility and antitumor activity of lactic acid bacteria isolated from the human gastrointestinal tract / A. Yu. Prosekov, L. S. Dyshlyuk, I. S. Milentjeva [et al.] // International Journal of Pharmacy and Technology. – 2016. – Vol. 8, № 2. – P. 13647–13661.
2. Proteorhodopsin light-enhanced growth linked to vitamin-B₁₂ acquisition in marine Flavobacteria / L. Gómez-Consarnau, J. M. González, T. Riedel [et al.] // The ISME Journal. – 2016. – Vol. 10. – P. 1102–1112. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.196>.
3. Воробьева, С. В. Влияние температуры на рост психрофильных бактерий, выделенных из пещер дальнего востока, средней Сибири и западного Кавказа / С. В. Воробьева, С. В. Хижняк, Л. Т. Харламова // Вестник КрасГАУ. – 2012. – Т. 72, № 9. – С. 117–121.
4. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies / S.-H. Yoon, S.-M. Ha, S. Kwon [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2017. – Vol. 67, № 5. – P. 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
5. *Flavobacterium collinsense* sp. nov., isolated from a till sample of an Antarctic glacier / Y. Zhang, F. Jiang, X. Chang [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – Vol. 66, № 1. – P. 172–177. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000688>.
6. Antioxidant and antimicrobial activity of bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria isolated from the human gastrointestinal tract / A. Yu. Prosekov, L. S. Dyshlyuk, I. S. Milentjeva [et al.] // Progress in Nutrition. – 2017. – Vol. 19, № 1. – P. 67–80. <https://doi.org/10.23751/pn.v19i1.5147>.
7. Vinuesa, P. GET_PHYLOMARKERS, a software package to select optimal orthologous clusters for phylogenomics and inferring pan-genome phylogenies, used for a critical geno-taxonomic revision of the genus *Stenotrophomonas* / P. Vinuesa, L. E. Ochoa-Sánchez, B. Contreras-Moreira // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00771>.
8. Biogeography of cryoconite bacterial communities on glaciers of the Tibetan Plateau / Y. Liu, T. J. Vick-Majors, J. C. Priscu [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. – 2017. – Vol. 93, № 6. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix072>.
9. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG / A. Mikheenko, A. Prjibelski, V. Saveliev [et al.] // Bioinformatics. – 2018. – Vol. 34, № 13. – P. i142–i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>.
10. Structural basis of glycogen biosynthesis regulation in bacteria / J. O. Cifuentes, N. Comino, J. Madariaga-Marcos [et al.] // Structure. – 2016. – Vol. 24, № 9. – P. 1613–1622. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.06.023>.
11. McInerney, J. O. Why prokaryotes have pangenomes / J. O. McInerney, A. McNally, M. J. O'Connell // Nature Microbiology. – 2017. – Vol. 2. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.40>.
12. Cryo-protective effect of an ice-binding protein derived from Antarctic bacteria / M. Mangiagalli, M. Bar-Dolev, P. Tedesco [et al.] // FEBS Journal. – 2017. – Vol. 284, № 1. – P. 163–177. <https://doi.org/10.1111/febs.13965>.
13. Microevolution and adaptive strategy of psychrophilic species *Flavobacterium bomense* sp. nov. isolated from glaciers / Q. Liu, H.-C. Liu, Y.-G. Zhou [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01069>.
14. Пикула, К. С. Психрофильные бактерии и их использование для биоремедиации арктических экосистем, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами / К. С. Пикула, А. М. Захаренко, А. Н. Гульков // Международный студенческий научный вестник. – 2016. – № 4–3. – С. 254–255.
15. Isolation and characterization of the lytic cold-active bacteriophage MYSP06 from the Mingyong glacier in China / M. Li, J. Wang, Q. Zhang [et al.] // Current Microbiology. – 2016. – Vol. 72, № 2. – P. 120–127. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0926-3>.

16. Identification of probiotic strains isolated from human gastrointestinal tract and investigation of their antagonistic, antioxidant and antiproliferative properties / A. Prosekov, I. Milentyeva, S. Sukhikh [et al.] // *Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 7, № 5.

17. Feller, G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology / G. Feller // *Scientifica*. – 2013. – Vol. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/512840>.

18. Ghosh, S. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? / S. Ghosh, N. Kuisiene, N. Cheeptham // *Biochemical Pharmacology*. – 2017. – Vol. 134. – P. 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>.

19. Психрофильные псевдомонады-эндофиты как потенциальные агенты в биоконтроле фитопатогенных и гнилостных микроорганизмов при холодильном хранении картофеля / А. В. Щербаков, Е. Н. Щербакова, С. А. Мулина [и др.] // *Сельскохозяйственная биология*. – 2017. – Т. 52, № 1. – С. 116–128. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.1.116rus>.

References

1. Prosekov AYu, Dyshlyuk LS, Milentyeva IS, Sukhikh SA, Babich OO, Ivanova SA, et al. Study of biocompatibility and antitumor activity of lactic acid bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *International Journal of Pharmacy and Technology*. 2016;8(2):13647–13661.

2. Gómez-Consarnau L, González JM, Riedel T, Jaenicke S, Wagner-Döbler I, Sañudo-Wilhelmy SA, et al. Proteorhodopsin light-enhanced growth linked to vitamin-B₁ acquisition in marine Flavobacteria. *The ISME Journal*. 2016;10:1102–1112. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.196>.

3. Vorobyeva SV, Hizhnyak SV, Kharlamova LT. Influence of temperature on growth of psychrophilic bacteria isolated from the caves of Far East, Middle Siberia and Western Caucasus. *Bulletin of KSAU*. 2012;72(9):117–121. (In Russ.).

4. Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017;67(5):1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.

5. Zhang Y, Jiang F, Chang X, Qiu X, Ren L, Qu Z, et al. *Flavobacterium collinsense* sp. nov., isolated from a till sample of an Antarctic glacier. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(1):172–177. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000688>.

6. Prosekov AYu, Dyshlyuk LS, Milentyeva IS, Sukhikh SA, Babich OO, Ivanova SA, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *Progress in Nutrition*. 2017;19(1):67–80. <https://doi.org/10.23751/pn.v19i1.5147>.

7. Vinuesa P, Ochoa-Sánchez LE, Contreras-Moreira B. GET_PHYLOMARKERS, a software package to select optimal orthologous clusters for phylogenomics and inferring pan-genome phylogenies, used for a critical geno-taxonomic revision of the genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00771>.

8. Liu Y, Vick-Majors TJ, Priscu JC, Yao T, Kang S, Liu K, et al. Biogeography of cryoconite bacterial communities on glaciers of the Tibetan Plateau. *FEMS Microbiology Ecology*. 2017;93(6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix072>.

9. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*. 2018;34(13):i142–i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>.

10. Cifuentes JO, Comino N, Madariaga-Marcos J, López-Fernández S, García-Alija M, Agirre J, et al. Structural basis of glycogen biosynthesis regulation in bacteria. *Structure*. 2016;24(9):1613–1622. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.06.023>.

11. McInerney JO, McNally A, O'Connell MJ. Why prokaryotes have pangenomes. *Nature Microbiology*. 2017;2. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.40>.

12. Mangiagalli M, Bar-Dolev M, Tedesco P, Natalello A, Kaleda A, Brocca S, et al. Cryo-protective effect of an ice-binding protein derived from Antarctic bacteria. *FEBS Journal*. 2017;284(1):163–177. <https://doi.org/10.1111/febs.13965>.

13. Liu Q, Liu H-C, Zhou Y-G, Xin Y-H. Microevolution and adaptive strategy of psychrophilic species *Flavobacterium bomense* sp. nov. isolated from glaciers. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01069>.

14. Pikula KS, Zakharenko AM, Gul'kov AN. Психрофил'ные бактерии и их использование для биоремедиации арктических экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами [Psychrophilic bacteria and their use for bioremediation of Arctic ecosystems polluted by oil and oil product]. *International Student Research Bulletin*. 2016;(4–3):254–255. (In Russ.).

15. Li M, Wang J, Zhang Q, Lin L, Kuang A, Materon LA, et al. Isolation and characterization of the lytic cold-active bacteriophage MYSP06 from the Mingyong glacier in China. *Current Microbiology*. 2016;72(2):120–127. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0926-3>.

16. Prosekov A, Milentyeva I, Sukhikh S, Dyshlyuk L, Babich O, Asyakina L, et al. Identification of probiotic strains isolated from human gastrointestinal tract and investigation of their antagonistic, antioxidant and antiproliferative properties. *Biology and Medicine*. 2015;7(5).

17. Feller G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica*. 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/512840>.

18. Ghosh S, Kuisiene N, Cheeptham N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochemical Pharmacology*. 2017;134:18–34. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>.

19. Shcherbakov AV, Shcherbakova EN, Mulina SA, Rots PYu, Daryu RF, Kiprushkina EI, et al. Psychrophilic endophytic *Pseudomonas* as potential agents in biocontrol of phytopathogenic and putrefactive microorganisms during potato storage. *Agricultural Biology*. 2017;52(1):116–128. (In Russ.). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.1.116rus>.

Сведения об авторах

Дышлюк Любовь Сергеевна

канд. био. наук, доцент, научный сотрудник, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, 14, тел.: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: SSukhikh@kantiana.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-7333-8411>

Бабич Ольга Олеговна

д-р техн. наук, директор Института живых систем, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, тел.: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: OOBabich@kantiana.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-4921-8997>

Остроумов Лев Александрович

д-р техн. наук, профессор, профессор-консультант, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, тел.: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: OKrigger@kantiana.ru

Сяоце Ван

Доктор PhD, доцент, Цицикарский университет, 161006, Китай, Цицикар, ул. Венхуа, 42, e-mail: stas-asp@mail.ru

Носкова Светлана Юрьевна

канд. техн. наук, научный сотрудник, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. А. Невского, 14, тел.: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: SNoskova@kantiana.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-1198-1951>

Сухих Станислав Алексеевич

канд. техн. наук, доцент, заведующий лабораторией, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, Россия, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, тел.: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: SSukhikh@kantiana.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>

Information about the authors

Lyubov S. Dyshlyuk

Cand.Sci.(Bio.), Associate Professor, Researcher, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: SSukhikh@kantiana.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-7333-8411>

Olga O. Babich

Dr.Sci.(Eng.), Director of the Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: OOBabich@kantiana.ru
 <https://orcid.org/0000-0002-4921-8997>

Lev A. Ostroumov

Dr.Sci.(Eng.), Professor, Professor-Consultant, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: OKrigger@kantiana.ru

Xiaojie Wang

Doctor PhD, Associate Professor, Qiqihar University, 42, Wenhua Str., Qiqihar, 161006, China, e-mail: stas-asp@mail.ru

Svetlana Yu. Noskova

Cand.Sci.(Eng.), Researcher, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: SNoskova@kantiana.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-1198-1951>

Stanislav A. Sukhikh

Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor, Head of the Laboratory, Immanuel Kant Baltic Federal University, 14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236016, Russia, phone: +7 (4012) 59-55-95, e-mail: SSukhikh@kantiana.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-7910-8388>