

Липилкина Татьяна Александровна

**ОСОБЕННОСТИ КОРОНАВИРУСОВ И КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ
НАСЕКОМОЯДНЫХ ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ ЕВРОПЕЙСКОГО ЮГА
РОССИИ И РИСК ПЕРЕНОСА КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Донской государственный технический университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ермаков Алексей Михайлович

Официальные оппоненты: **Забережный Алексей Дмитриевич**
доктор биологических наук, профессор,
академик Российской академии наук,
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и
технологический институт биологической промышленности»,
советник по научной работе

Равилов Рустам Хаметович
доктор ветеринарных наук, профессор
ФГБОУ ВО «Казанский государственный аграрный
университет», профессор кафедры «Эпизоотология,
паразитология и патологическая анатомия»

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии
и микробиологии» (Владимирская обл., Петушинский р-н.,
пос. Вольгинский)

Защита состоится «__» _____ 2026 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.01 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Вавиловский университет и на сайте www.vavilovsar.ru

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3, ученому секретарю диссертационного совета, эл. почта: nkichemazova@inbox.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Кичемазова Наталья Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Возбудители коронавирусной инфекции (CoV инфекции) – коронавирусы (CoV) – одни из самых распространенных видов вирусов (Markotter W., Coertse J., de Vries L. , 2020). Входят в подсемейство Orthocoronavirinae, семейство Coronaviridae, порядок Nidovirales. Представляют собой группу крупных оболочечных одноцепочечных РНК-вирусов. CoV формируют четыре рода: *Альфакоронавирусы*, *Бетакоронавирусы*, *Гаммакоронавирусы* и *Дельтакоронавирусы*. По имеющимся на сегодняшний день данным, все CoV являются причиной зоонозных инфекций, обладают высокой изменчивостью и мутационной активностью. Из-за мутаций и различных рекомбинаций геномов CoV, которые приводят к постоянному появлению новых штаммов с более высокой вирулентностью, они быстро распространяются и преодолевают межвидовой барьер, вызывая как инфекционные болезни диких животных, так и общие для животных и человека (Lai M.C., Cavanagh D., 2006). Летучие мыши представляют собой важный, но не до конца охарактеризованный резервуар CoV, имеющий антропозоонозный потенциал. При этом появление зоонозных патогенов летучих мышей непосредственно связано со здоровьем людей, животных и с окружающей средой (Wacharapluesadee S., Tan C.W., Maneeorn P. И., 2021).

CoV инфекции передаются преимущественно респираторным и фекально-оральным путями и широко распространены среди млекопитающих и птиц, вызывая в основном респираторные и кишечные заболевания, в каких-то случаях – неврологические заболевания и гепатиты (Arnaout Y., Djelouadji Z., Robardet E., 2022).

Летучие мыши являются одним из самых разнообразных отрядов млекопитающих, который включает более 1400 видов и составляет примерно 20 % мировой популяции млекопитающих (Pena S.A., Alencastre-Santos A.B., da Silva J.B., 2023). Относительно долгая продолжительность жизни, способность летать, уникальные иммунные реакции и их взаимосвязь с микробиомом отличают летучих мышей от других млекопитающих (Donnik I.M., Chikindas M.L., Ermakov A.M. , 2021).

В последние годы летучие мыши привлекают особое внимание ученых, потому что являются потенциальным природным резервуаром для многочисленных заболеваний. Вирусы Нипах и Хендра, вирусы, связанные с Эболой, SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 являются одними из наиболее значимых вирусов, которые нанесли огромный ущерб общественному здоровью (Islam M.S. , Sazzad H.M, Satter S.M., 2016; Edson D., Field H., McMichael L., 2015; Goldstein T., Anthony S.J., Gbakima A., 2018). Проведенный анализ показал, что упомянутые вирусы происходят от летучих мышей и некоторые виды из их популяции могут быть промежуточным резервуаром инфекций человека и животных (Porov I.V., Ohlopkova O.V., Donnik I.M., 2023).

Глобализация и урбанизация являются общественными процессами, которые опосредованно способствуют распространению различных инфекционных агентов среди людей, в том числе через синантропных животных. Большинство возникающих патогенов, полученных от летучих мышей, имеют вирусное происхождение, поэтому вирусное разнообразие летучих мышей изучается тщательнее, чем их бактериальная микробиота; исследования же как раз доказывают, что летучие мыши являются устойчивыми носителями бактерий, обладают резистентностью к антибактериальным препаратам, а это всё вместе значимо для гуманной и ветеринарной медицины (Devnath P., Karah N., Graham J.P., 2022; Becker P., van den Eynde C., Baert F., 2023).

Несмотря на наличие многочисленных исследований CoV у летучих мышей как их промежуточных хозяев, до сих пор существуют неизученные CoV, переносимые летучими мышами в зависимости от их вида и места обитания. Изучение данной научной проблемы актуально в связи с недостаточным исследованием риска зоонозной и антропозоонозной передачи CoV и, с учётом отсутствия сведений по видовому составу CoV в популяциях летучих

мышей, обитающих на Европейском Юге России, теми особенностями бактериальной микробиоты кишечника у летучих мышей, которые предопределяют носительство CoV и их распространение. Поскольку данные о видовом составе CoV у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея, и особенностях их кишечной микробиоты отсутствуют – это не позволяет корректно спрогнозировать эпизоотические и эпидемические вспышки, вызванные CoV. А также, освоить новые методы их анализа и предотвращения в зависимости от видового состава кишечной микробиоты, как фактора носительства различных CoV.

Таким образом, летучие мыши, обитающие на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея, являются носителями различных ранее не изученных CoV и имеют определенные штаммы бактерий в кишечной микробиоте, что предопределяет носительство CoV и риск их межвидовой передачи другим животным.

Степень разработанности темы

Интерес к изучению летучих мышей как переносчиков CoV инфекции связан с тем, что летучие мыши являются промежуточными хозяевами CoV, которые могут приводить к эпидемиям и эпизоотиям. На сегодня есть научные данные о разнообразии переносимыми летучими мышами CoV. Однако недостаточно данных о причинах резистентности летучих мышей к различным CoV.

Бактериальная микробиота кишечника у летучих мышей специфична и зависит от пищевых привычек, сезонности, физиологических сдвигов, связанных со спячкой. Но роль бактериальной микробиоты кишечника у летучих мышей как кофактора их резистентности к CoV до конца не изучена. В частности, анализ бактерий в образцах фекалий летучих мышей может дать представление о штаммах, способных продуцировать метаболиты, включая бактериоцины, которые могут способствовать местному иммунитету. Также, отсутствуют рекомендации для целевых противоэпизоотических мер в отношении CoV у летучих мышей определённых видов.

Таким образом, предположением для проверки является то, что летучие мыши, обитающие на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея, являются носителями различных ранее не изученных CoV, а также имеют определенные штаммы бактерий в кишечной микробиоте, что предопределяет носительство CoV и риск их межвидовой передачи другим животным. Отсутствие научных данных о видовом составе CoV у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея, и особенностях их кишечной микробиоты не позволяет корректно спрогнозировать эпизоотические и эпидемические вспышки, вызванные CoV, а также освоить новые методы их анализа и предотвращения в зависимости от видового состава кишечной микробиоты как стимулирующего фактора носительства различных CoV.

Цель исследования – генетическая и эпизоотологическая характеристика CoV и некоторых штаммов бактерий кишечной микробиоты у насекомоядных летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея для определения риска переноса CoV инфекции.

Данная цель достигается выполнением **следующих задач:**

1. Произвести сбор биоматериала (орофарингеальные, ректальные мазки) у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.
2. Провести кПЦР (HRM-анализ) для детекции РНК CoV в отобранных образцах биоматериала и метагеномное исследование с применением секвенирования для описания обнаруженных CoV.

3. Установить филогенетическую взаимосвязь и родство обнаруженных CoV с другими патогенными CoV с известной последовательностью генома.

4. Изучить состав и характеристики некоторых штаммов бактерий кишечной микробиоты у летучих мышей, обитающих на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.

5. Определить риск переноса CoV инфекции от летучих мышей, обитающих на территориях Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.

Научная новизна

Впервые на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея было проведено генетическое и эпизоотологическое исследование CoV, переносимых летучими мышами. В ходе исследования получены новые данные о носительстве CoV среди летучих мышей видов рыжая вечерница, средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, большой подковонос, водяная ночница, европейская широкоушка, а также впервые установлены филогенетическая взаимосвязь и родство с другими ранее установленными патогенными CoV.

Впервые из образцов фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница, обитающих на территории Ростовской области, были выделены бактериоциногенные штаммы *Enterococcus faecium* ST01TL и ST76TL, охарактеризованы их потенциал производства бактериоцинов, свойства в подавлении факторов вирулентности, вследствие чего был определён эпизоотологический риск передачи CoV инфекции от летучих мышей к другим животным и человеку.

Теоретическая и практическая значимость работы

Доказано, что распространённость CoV у насекомоядных летучих мышей Европейского Юга России не зависит от их вида, пола и ареала.

Микробиота кишечника летучих мышей видов рыжая вечерница, средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, большой подковонос, водяная ночница, европейская широкоушка может способствовать формированию их устойчивости к патогенным возбудителям CoV. Идентифицированы и охарактеризованы штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL из образцов фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница, обладающие свойствами формировать биоплёнки для устойчивости летучих мышей к CoV инфекции.

Впервые для эпизоотологической оценки риска передачи CoV от летучих мышей Европейского Юга России использованы методики биоинформационного анализа. Исходя из их геномной структуры в сравнении с другими CoV с установленной ранее последовательностью генома, определено филогенетическое родство CoV летучих мышей Европейского Юга России, даны практические предложения по мерам профилактики передачи CoV.

Результаты диссертации используются в учебной деятельности кафедры «Биология и общая патология» Донского государственного технического университета (акт о внедрении результатов от 01.12.2025) (Приложение А) и научно-практической деятельности лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «РостовНИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (справка о внедрении результатов от 01.12.2025) (Приложение Б).

Методология и методы исследования

Методология исследования определялась в соответствии с изученными трудами отечественных и зарубежных ученых. В работе использованы аналитические, лабораторные, статистические и эпизоотологические методы исследования. Совокупность используемых методов позволила обеспечить достоверность приведенных в работе результатов и выводов.

Основные научные положения, выносимые на защиту:

1. Разница в превалентности CoV в зависимости от вида летучих мышей, пола, происхождения мазка (орофарингеальный, ректальный) и выбранного для исследования ареала не установлена.
2. Обнаруженные CoV у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос на территории Краснодарского края и Республики Адыгея принадлежат к *Бетакоронавирусам*, что относит их к потенциальным возбудителям CoV инфекций животных и человека.
3. SARS-подобных CoV среди летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территории Краснодарского края и Республики Адыгея, не обнаружено.
4. Полученные у летучих мышей вида рыжая вечерница конкурентно устойчивые штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL обладают стабильностью к гидрофильным химическим веществам, что позволяет им формировать биоплёнки на поверхности клеток кишечника, которые могут быть барьером от CoV.
5. Метаболиты бактерий кишечной микробиоты летучих мышей *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp* и штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL способствуют неспецифической устойчивости к CoV, что предопределяет неманифестные формы CoV инфекции у летучих мышей.
6. Введение целевых противозoonотических мер в отношении CoV у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос — на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея нецелесообразно.

Работа выполнена на кафедре «Биология и общая патология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Донской государственный технический университет» и одобрена локальным независимым этическим комитетом (протокол № 2 от 26.02.2021) (Приложение В). Финансирование диссертационной работы осуществлялось за счет грантов: РФФИ № 20-04-60263/21 от 24.09.2021 «Коронавирусы синантропной фауны юга России и риск межвидового переноса коронавирусной инфекции», РНФ № 23-14-00316 от 15.05.2023 «Особенности иммунной системы и кишечной микробиоты синантропных рукокрылых как основа прогнозирования новых инфекций»; а также стипендии Президента Российской Федерации для обучающихся за рубежом (приказ Минобрнауки России № 836 от 31.08.2023).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность исследования подтверждена объемом выборки обследованных летучих мышей и результатами молекулярно-генетических и микробиологических исследований. Все исследования были выполнены на сертифицированном оборудовании, результаты обработаны современными статистическими методами.

Результаты диссертационной работы были представлены на: V Южно-Российском международном ветеринарном конгрессе (Ростов-на-Дону, 2019), III Международном симпозиуме «Единое здоровье» (Ростов-на-Дону, 2019), IV Международном симпозиуме «Единое здоровье» (Ростов-на-Дону, 2021), XIV Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса – ИНТЕРАГРОМАШ 2021» (Ростов-на-Дону, 2021), International Conference on Beneficial Microbes (ICOMB-2021) (Ростов-на-Дону, 2021), XV Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса – ИНТЕРАГРО 2022» (Ростов-на-Дону, 2022), Yakult International Symposia on Beneficial Microbes, Windham Sao Paulo Ibirapuera Convention Plaza (Сан Пауло, Бразилия, 2025), 79-я Итоговой научной конференции

(Ростов-на-Дону, 2025), 18th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health – IPC 2025 (Афины, Греция, 2025).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 11 работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях по перечню ВАК и приравненных к ним, входящих в международные базы Scopus и Web of Science.

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных источников, планировании исследований, формулировании задач, сборе биологического материала, проведении молекулярно-генетических исследований, оформлении первичной документации, статистической обработке и обобщении полученных результатов, подготовке публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из: введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих объекты, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, практических предложений, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Представлена на 159 страницах машинописного текста и включает 13 рисунков, 16 таблиц, 6 приложений, 196 источников литературы.

Благодарности. Автор благодарит Попова Игоря Витальевича, PhD, научного руководителя, д.б.н., профессора Ермакова Алексея Михайловича, профессора факультета фармацевтических наук Университета Сан-Паулу (Бразилия) Светослава Димитрова Тодорова за помощь на всех этапах проведения исследований и написания диссертационной работы.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты, материалы и методы

Объект исследования – CoV летучих мышей следующих видов: рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*), средиземноморский нетопырь (*Pipistrellus kuhlii*), поздний кожан (*Eptesicus serotinus*), малый подковонос (*Rhinolophus hipposideros*), большой подковонос (*Rhinolophus ferrumequinum*), водяная ночница (*Myotis daubentonii*), европейская широкоушка (*Barbastella barbastellus*) – обитающие на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея.

Предмет исследования – РНК CoV, выделенная из орофарингеальных и ректальных мазков; бактерии из ректальных мазков и фекалий летучих мышей видов рыжая вечерница, средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, большой подковонос, водяная ночница, европейская широкоушка.

*Отбор биоматериала в Ростовской области, в Республике Адыгея, в Краснодарском и Ставропольском краях у летучих мышей для идентификации
коронавирусов и кишечных бактерий*

Было отобрано с марта по июнь 2021 г. 300 проб (орофарингеальных (n=150) и ректальных (n=150) мазков) от 150 летучих мышей.

Виды летучих мышей, включенных в исследование, и число проб от каждого вида: рыжая вечерница (43; 28 %), средиземноморский нетопырь (22; 15 %), поздний кожан (24; 16 %), малый подковонос (53; 35 %), большой подковонос (1; 1 %), водяная ночница (1; 1 %), европейская широкоушка (6; 4 %).

Число мазков у каждого вида летучих мышей в зависимости от пола распределено следующим образом. Среди самцов: рыжая вечерница (18; 35,3 %), средиземноморский нетопырь (10; 6,6 %), поздний кожан (7; 4,7 %), малый подковонос (14; 9,3 %), большой подковонос (2; 1,3 %), водяная ночница (1; 0,7 %), европейская широкоушка (1; 0,7 %). Среди самок: рыжая вечерница (25; 16,7 %), средиземноморский нетопырь (12; 8 %), поздний кожан (17; 11,3 %), малый подковонос (39; 26 %), большой подковонос (4; 2,7 %).

Выделение РНК для детекции коронавирусов у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос

Экстракция РНК проводилась с помощью набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Обратная транскрипция проводилась с использованием набора MMLV RT («Евроген», Россия) по протоколу производителя для жидких вирусосодержащих образцов с использованием случайных декануклеотидных праймеров. ДНКазная обработка проводилась с помощью ДНКазы I (Thermo-Fisher Scientific, США) по протоколу производителя.

кПЦР-исследование проводилось с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) по протоколу производителя для жидких вирусосодержащих образцов с использованием декануклеотидного праймера.

В качестве праймеров использовались вырожденные праймеры из L. Vijgen и соавт. (2008), имеющие последовательности:

F: 5'-ACWCARHTVAAYYTNAARTAYGC-3'
R: 5'-TCRCAYTTDGGRTARTCCCA-3'

Синтез олигонуклеотидов, в том числе вырожденных праймеров, проводился по техническому заданию компанией «Евроген» (Россия).

Исследование *in silico* возможности использования праймеров для детекции CoV проводилось с помощью биоинформационных инструментов NCBI Blast, Sequence Searcher и следующих записей в базе NCBI Nucleotide: EF584908.1, DQ249235.1, AF391541.1, JX860640.1, KC461235.1, AF304460.1, AY567487.2, AY391777.1, KC008600.1, X51939.1, JQ065043.2, NC_003436.1, AY864806.1, NC_016992.1, NC_010800.1, DQ811789.2, NC_016991.1, NC_045512.2, NC_004718.3, NC_038294.1.

Программа ПЦР была следующей: 1 цикл по 5 мин при 95 °C, 54 цикла по 15 сек при 94 °C, 30 сек при 44 °C, 30 сек при 60 °C, 1 цикл HRM-анализа, начиная шагом 0,15 °C, при 60 °C и до 95 °C.

Анализ термодинамических характеристик праймеров проводился с помощью OligoCalc (<http://oligocalc.eu>) и IDT OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Проведение масс-спектрометрии для идентификации бактерий из ректальных мазков летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос

Для масс-спектрометрической идентификации были использованы чистые суточные бактериальные культуры.

Для идентификации видов бактерий методом MALDI-TOF MS был использован настольный масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия). Подготовку к исследованию чистых культур штаммов и проведение анализа осуществлялось согласно инструкции к прибору. Уровень идентификации бактерий оценивался по критериям, указанным в инструкции.

Профили микроорганизмов были получены с использованием Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Германия) с программным обеспечением FlexControl (Bruker Daltonics, Германия). Визуализация проводилась с помощью программного обеспечения flexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия).

После идентификации отобранных изолятов при помощи масс-спектрометрии определились их мутагенные и антиоксидантные свойства.

Культивирование отобранных изолятов бактерий и исследование мутагенных и антиоксидантных свойств при помощи биосенсоров

Культивирование лактобактерий. В пробирку с 10 мл жидкой среды LB вносили культуру лактобактерий и культивировали в течение 48 ч при 37 °C. Супернатант получен путем центрифугирования культур (Minispin-plus; Eppendorf, Германия) (7 мин, 13 000 × g).

Культивирование бацилл. Штаммы *Bacillus* росли в течение 24 ч в жидкой среде LB в термостате при 37 °С. Супернатант был получен, как описано выше.

Культивирование бактерий происходило до ранней или средней логарифмической фазы. Ночная культура разбавлялась свежей средой до плотности 0,01–0,1 единица Мак-Фарланда (концентрация 3×10^7 – 3×10^6 клеток/мл).

Биосенсоры на основе *E. coli* MG1655 с промоторами pKatG-luxPkatG и pRecA-luxPsoxS фиксируют наличие в среде окислителей, образующихся в клетке. Биосенсор с плазмидами pRecA, pColD фиксируют наличие в клетке факторов, вызывающих повреждение ДНК.

В качестве индуктора повреждений ДНК использовался 1,4-диоксид 2,3-хиноксалиндиметанол (диоксидин) («Биосинтез», Россия) в концентрации $2,25 \times 10^5$ М, для индукции окислительных повреждений – перекись водорода (Ferrain, Франция) в концентрации 10^3 М.

Измерения плотности проводились при помощи денситометра DEN-1B (Biosan, Латвия). Затем суспензию выращивали в течение 2 ч до ранней логарифмической фазы. Аликвоты этой культуры (по 90 мкл) переносили в стерильные ячейки (находящиеся в стрипах планшета) и добавляли к ним по 10 мкл тестируемого препарата (кроме контрольных ячеек). В контрольные ячейки добавляли 10 мкл деионизированной воды. Также вносили по 10 мкл соответствующего индуктора либо стерильной дистиллированной воды. После обработки планшет с пробами помещали в люминометр и инкубировали при 30 °С. Интенсивность биолюминесценции измерялась каждые 10–15 мин.

Для измерений люминесценции использовался микропланшетный люминометр ЛМ-01Т (Immunotech, Чехия) мультимодальный ридер FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Германия).

Фактор индукции SOS ответа/окислительного стресса/повреждения ДНК (Is) вычислялся по формулам, представленных в формате кода статистической обработки, созданного при помощи языка программирования R v4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Австрия).

*Отбор биоматериала у летучих мышей вида рыжая вечерница
для анализа бактериоциногенных штаммов бактерий*

Для изучения бактерий кишечной микробиоты использовали (фекалии) летучих мышей вида рыжая вечерница из Ростовской области. На момент отбора образцов летучие мыши находились в периоде гибернации, Центре реабилитации летучих мышей ДГТУ. Биоматериал отбирался из контейнеров, в которых проживало одновременно несколько летучих мышей (4–9 особей). Было собрано 7 пробирок с биоматериалом различной массы.

Для выделения бактериоциногенных штаммов образцы фекалий гомогенизировали в стерильном NaCl 1:9 (0,85 % NaCl, м/о) путем перемешивания в течение 2 мин и 10-кратно разводили тем же разбавителем, после высевали на бульон MRS (Oxoid, Великобритания), дополненный 2 % бактериологическим агаром (м/о) (Oxoid, Великобритания). С целью создания аэробных условий был нанесен второй слой 2 % агара, чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 ч в аэробных условиях. С целью предварительного отбора колоний с потенциальной продукцией антимикробных метаболитов был нанесен новый слой сердечно-мозгового настоя (ВН) (Becton, Dickinson and Company Sparks, Франция), дополненный 2 % агаром и исследуемыми микроорганизмами в конечной концентрации 10^6 КОЕ/мл, далее чашки инкубировали еще 24 ч при 37 °С.

В качестве контрольных (патогенных) микроорганизмов использовали *Listeria monocytogenes* 422, 603 и 620 (коллекция ProBacLab, факультета фармацевтических наук, Университет Сан-Паулу, SP, Бразилия). Через 24 ч в чашках Петри наблюдались колонии, представляющие ингибирующие зоны. Колонии отобраны и перенесены в 5 мл бульона MRS, их инкубировали при 37 °С. После культивирования в бульоне MRS при 37 °С в течение 24 ч, был получен бесклеточный супернатант с помощью центрифугирования ($5\,000 \times g$, 10 мин, 20 °С), pH был скорректирован до 5,5–6,5 с 1 М NaOH, чтобы исключить возможное антимикробное

воздействие слабых органических кислот. Образцы дополнительно обрабатывались в течение 10 мин при 80 °С для инактивации потенциально продуцируемых протеаз или H₂O₂. Была подготовлена среда ВНИ с добавлением 2 % агара с конечной концентрацией 10⁶ КОЕ/мл *L. monocytogenes* 422, 603 и 620, на поверхность чашек наносили 10 мкл предварительно приготовленного супернатанта. Чашки Петри инкубировали в течение 24 ч при 37 °С.

Культивирование бактерий из фекалий летучих мышей вида рыжая вечерница

К каждому образцу фекалий добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:10, размешивали до растворения, после разводили стерильным NaCl в соотношении 1:6 после инкубации при температуре 24 °С в течение 24 ч сеяли на чашки Петри (49 разделений) каждое разведение сеяли четырехкратно (196 чашек Петри).

Чашки Петри инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. После инкубирования провели оценку наличия выросших культур: культуры выросли в 72 чашках, 72 чашки Петри были пусты, в 52 чашках Петри невозможно подсчитать число колоний (>300).

Все выросшие культуры были круглой формы, однородной расцветки (белые), имели ровные края и четкий контур. К ним добавили слой ВНИ и инкубировали 24 ч при температуре 37 °С, зоны роста присутствовали в 32 чашках Петри. Из каждой чашки Петри с зонами роста были взяты мазки и посеяны в 5 мл MRS (86 пробирок). В 18 чашках Петри размыты границы, взяты мазки (38 пробирок). 124 пробирки отправлены на 24 ч в инкубатор при 37 °С.

Было выделено 6 культур №№ 1, 10, 76, 77, 85, 122. Культуры сеяли в чашки Петри с агаром ВНИ и *L. monocytogenes* 101, 211, 302, 422, 603 и 620 инкубировали 24 часа при 37 °С.

Зоны роста были обнаружены на чашках Петри с ВНИ: с *L. monocytogenes* 422 с культурой №1 и 122; *L. monocytogenes* 603 с культурой №10 и 85; *L. monocytogenes* 620 с культурой №10, 76, 77 и 85. Бактериальная нагрузка во всех образцах варьировалась от $2,5 \times 10^7$ КОЕ/мл до $6,9 \times 10^7$ КОЕ/мл.

Биомолекулярная дифференциация и идентификация изолятов

Предварительно отобранные бактериальные культуры выращивали при 37 °С в течение 24 ч в 20 мл MRS, экстрагировали общую ДНК с помощью набора ZR Fungal/Bacterial Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit, DNA (Zymo Research, США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту полученной геномной ДНК оценивали с помощью NanoPhotometer (Implen, Германия).

Концентрация ДНК каждого изолята была доведена до 50 нг/мкл. Реакции ПЦР были выполнены с использованием праймера (5'-(GTG)5-3') на 96-луночном термоциклере Veriti (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные ампликоны были визуализированы в 1,0 % агарозном геле, дополненном гелем-красителем SYBR® Safe DNA (Thermo Fisher Scientific, США) в буфере 0,5×TAE для гель-электрофореза, после визуализированы на оборудовании Molecular Imager® GelDoc™ XR (Bio-Rad, США).

Изоляты предварительно были исследованы на основании биохимических, физиологических и морфологических наблюдений согласно Справочнику Берджи (2009). Дальнейшая таксономическая идентификация штаммов, представляющих интерес, была основана на секвенировании амплифицированного гена 16S рРНК, где была проведена ПЦР, как описано у Lima и соавт. (2024) Праймеры:

F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

Для амплификации использовался ген 16S рРНК для последующей идентификации на видовом уровне. Реакции ПЦР были выполнены на термоциклере Applied Biosystems Veriti™ (Thermo Fisher Scientific, США), полученные продукты ПЦР были разделены с помощью гель-электрофореза на 1% (w/v) агароза, окрашенного гелем SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, США), и визуализированы с помощью Molecular Imager® Gel Doc™ XR (Bio-Rad, США). Полученные ампликоны были секвенированы в Центре исследований генома

человека, Институте биомедицинских наук, Университете Сан-Паулу, Сан-Паулу, Бразилия) с помощью секвенирования ДНК по Сэнгеру (набор для циклического секвенирования BigDye Terminator v3.1) и идентифицированы с помощью Sequencing Analysis 7.0 (KB™ Basecaller).

На основании тестов ингибирования и идентификаций для следующих тестов было отобрано шесть микробных культур, названных: ST01TL, ST10TL, ST76TL, ST77TL, ST85TL и ST122TL, идентифицированы как *Enterococcus faecium*.

После процедуры дифференциации ПЦР для последующих экспериментов были отобраны культуры *E. faecium* : ST01TL и ST76TL. Выбранные культуры выращивали в 20 мл MRS в течение 24 ч при 37 °С, а супернатант получали центрифугированием (10,000×g, 10 мин, 20 °С). рН супернатант был доведен до диапазона 5,5-6,5 с помощью 1М NaOH и подвергнут термической обработке в течение 10 мин при 80 °С.

Подтверждение белковой природы ингибирующего метаболита штаммов E. faecium : ST01TL и ST76TL и стабильности антимикробных пептидов к воздействию температуры, рН и выбранных химикатов

Для подтверждения белковой природы ингибирующего метаболита к 1,0 мл супернатанта добавили протеазу К (Promega, США) в концентрации 0,1 мг/мл и 1,0 мг/мл, далее инкубировали 1 ч при 37 °С. Для остановки ферментативных реакций образцы были подвергнуты термической обработке в течение 5 минут при 99-100 °С в сухой бане Accublock Digital Dry Bath (Labnet International, США). Остаточную антимикробную активность во всех экспериментальных установках оценивали в отношении штаммов *L. monocytogenes* 422, 603 и 620. Для оценки влияния рН на стабильность полученных антимикробных пептидов аликвоты из ранее полученного супернатанта доводили до различных уровней рН (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 12,0) с помощью 1 М NaOH или 1 М HCl, после инкубировали 2 ч при 37°С, рН был скорректирован обратно до диапазона 5,5-6,5 и протестированные на остаточную антимикробную активность в отношении *L. monocytogenes* 422, 603 и 620.

В эксперименте оценки влияния различных температур на стабильность полученных антимикробных белков, аликвоты из супернатанта были подвергнуты воздействию в течение 2 ч при температурах: 8, 30, 37, 40, 60, 80, 100 и 122 °С и протестированы на остаточную антимикробную активность в отношении *L. monocytogenes* 422, 603 и 620.

Мониторинг роста бактериоциногенных штаммов E. faecium , продукция антимикробных пептидов и изменение рН

Рост бактерий оценивали согласно изменениям оптической плотности (OD), при 600 нм на спектрофотометре Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, США) ежечасно, изменения рН оценивали с помощью рН-метра (Láctea Aparelhos Científicos e Eletrônicos LTDA, Сан-Паулу, Бразилия). Также, для каждой установки оценивалась продукция антимикробных пептидов (бактериоцинов) (активность выражалась в у.е./мл), определяемая каждые 3 ч.

Для определения конкретных уровней активности экспрессируемых бактериоцинов супернатант получали, как описано ранее, и готовили серию двукратных разведений со стерильным 25 mM калий-фосфатным буфером с рН 6,5. На следующем этапе аликвоты по 10 мкл из каждого ранее приготовленного разведения наносили на чашки Петри с ВНИ, дополненный 1 % агаром, с включенными *L. monocytogenes* 422, 603 и 720 в конечной концентрации 10⁵ КОЕ/мл, приготовленными, как описано ранее. Чашки Петри инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. После рассчитали удельный уровень активности бактериоцина (выраженный в у.е./мл) с учетом типа серийного разведения (двукратное), объема в мл (0,01 мл), примененного в тесте, и максимального разведения, все еще представляющего зону ингибирования.

Оценка воздействия супернатанта из бактериоциногенных штаммов E. faecium на L. monocytogenes

В ходе эксперимента *L. monocytogenes* 422, 603 и 620 были добавлены к 200 мл 2 % ВНИ и инкубированы при 37 °С. Рост бактериоцинов оценивали в соответствии с изменениями в регистре OD 600 нм. Супернатант исследуемых бактериоциногенных штаммов ST01TL и ST76TL пропускали через фильтр 0,22 мкм (Kasvi, Испания) и добавляли к экспоненциально растущей культуре *L. monocytogenes* 422, 603, 620 (через 3 ч после инокуляции). Изменения в росте бактерий регистрировали в течение следующих 12 ч на спектрофотометре Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, США). у.е./мл примененных бактериоцинов оценивали, как описано ранее. *L. monocytogenes* ATCC 422, 603 и 620 без добавления бактериоцинов служили контролем роста.

Для оценки спектра активности были использованы штаммы из коллекции ProBacLab, факультета фармацевтических наук Университета Сан-Паулу. Все штаммы культивировались в питательных средах (MRS или ВНИ) при 37 °С в течение 24 ч.

Оценка свойств бактериоциногенных штаммов E. faecium

Продукция желатиназы исследовалась в соответствии с рекомендациями dos Santos и соавт. (2020). Выбранные культуры были выращены в бульоне MRS с желатином 5 % (Oxoid, Великобритания) (w/v) при 37 °С в течение 24 ч. В качестве положительного контроля использовали *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, а необработанная среда (MRS, с 5% желатина) использовалась в качестве отрицательного контроля.

Чтобы оценить потенциальную выработку протеолитических ферментов исследуемые культуры сеяли на MRS агар с добавлением 10 % сухого обезжиренного молока (Molico[®], Nestlé, Бразилия) или 10 % казеина (Difco Laboratories, США). Чашки инкубировали при 37 °С в течение 72 ч. Согласно исследованиям Domingos-Lopes и соавт. (2017) наличие прозрачной зоны вокруг колоний говорило о протеолитической активности.

Для гемолитической активности исследуемые культуры сеяли штрихами на чашки Петри с кровяным агаром (триптиказо-соевый агар с 5 % овечьей крови) и инкубировали при 37 °С в течение 48 ч.

Для оценки способности продуцировать муцин исследуемыми штаммами применялись рекомендации Monteagudo-Mera и соавт. (2012). Среда MRS была приготовлена в соответствии с составом коммерческого продукта с исключением глюкозы как источника углерода. Модифицированная среда MRS без глюкозы была дополнена 1,5 % агара (w/v) с добавлением 0,3 % НГМ (w/v) (свиной желудочный муцин, тип III, Sigma-Aldrich, США) или 1 % глюкозы (w/v) в качестве контроля. На следующем этапе аликвоты по 10 мкл каждой выбранной культуры наносили на чашки Петри и инкубировали в аэробных условиях при 37 °С в течение 72 ч. На следующем этапе сформированные колонии окрашивали 0,1 % черным крахмалом (w/v) в 3,5 М уксусной кислоте в течение 30 мин. Чашки Петри промывали 1,2 М уксусной кислотой и наблюдали за зоной лизиса муцина вокруг колоний.

Скрининг бактериоциногенных штаммов E. faecium ST01TL и ST76TL на наличие генов вирулентности

ДНК, выделенная из штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL, была исследована с помощью ПЦР с праймерами, перечисленными в таблице 1. Все реакции ПЦР проведены на термоциклере Veriti 96 (Applied Biosystems, США).

Таблица 1 – Праймеры, применяемые для оценки безопасности полезных свойств, связанных с изучаемыми штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Ген	Праймер последовательности	Источник, протокол	ST01TL	ST76TL
<i>gelE</i>	5'-TATGACAATGCTTTTTGGGAT-3' 5'-AGATGCACCCGAAATAATATA-3'	Vankerckhoven и соавт. (2004)	+	+
<i>ace</i>	5'-GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG-3' 5'-GTCTGTCTTTTCACTTGTTC-3'	Martin-Platero и соавт. (2009)	+	+
<i>asa</i>	5'-GCACGCTATTACGAACATGA-3' 5'-TAAGAAAGAACATCACCACGA-3'	Vankerckhoven и соавт. (2004)	+	-
<i>gad</i>	5'-CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTCG-3' 5'-TCATATTGACCGGTATAAGTGATGCC-3'	Valledor и соавт. (2022)	+	+
<i>enterocin P</i>	5'-ATGAGAAAAAATTATTTAGTTT-3' 5'-TTAATGTCCCATACCTGCCAAACC-3'	Fugaban и соавт. (2021)	-	+

Оценка свойств штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL культивировали при 37 °С в течение 24 ч, после получали клетки с помощью центрифугирования (4000 × g, 10 мин, 4 °С). Полученные клетки промывали и взбалтывали в 25 мМ калий-фосфатном буфере с pH 6,5. Полученную суспензию клеток доводили до оптической плотности (OD) 560 нм около 1,0 и смешивали в пропорции 5:1 с н-гексадеканом и встряхивали в течение 2 мин. Данные образцы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, и регистрировали OD при 560 нм водной фазы. Уровень гидрофобности, выраженный в процентах, рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ гидрофобности} = \frac{(\text{OD}_{560} (\text{показание 1}) - \text{OD}_{560} (\text{показание 2}))}{\text{OD}_{560} (\text{показание 1})} \times 100$$

Скрининг на наличие генов бактериоцинов в ДНК изучаемых штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL

ДНК, выделенную из исследуемых штаммов, оценивали на наличие известных генов бактериоцинов. Эксперименты проводились с праймерами, разработанными для нацеливания на: низин, педиоцин PA-1, энтероцин А, энтероцин В, энтероцин Р и энтероцин 50. Реакции ПЦР проводились на термоциклере Veriti 96 (Applied Biosystems, США). Полученные ампликоны разделяли на электрофореze в агарозном геле (1-2 %, вес/объем) с учетом размера целевых ампликонов, окрашивали и визуализировали.

Результаты биоинформационного анализа панкоронавирусных праймеров и их способность детектировать РНК различных видов CoV

В результате исследования было установлено, что вырожденные праймеры, описанные в статье L. Vijgen et al. (2008), способны детектировать не только 5 видов CoV из различных таксономических групп, но и с варьирующей вероятностью еще около 300 других CoV.

С помощью биоинформационного анализа была показана полная гомология последовательностей праймеров и целевых участков геномов для 17 CoV из различных таксономических групп. Таким образом, праймеры подходили для скринингового исследования на наличие РНК CoV в исследуемых образцах.

После проведения серии биоинформационных исследований, праймеры были синтезированы и испытаны в тестовом эксперименте с синтетическим конструктором, соответствующим целевому участку детекции в геноме указанных CoV на примере коронавируса Guangxi/F230/2006.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация РНК в биоматериале у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос

Средняя концентрация РНК в жидких образцах орофарингеального зонда составляла 2,67 нг/мкл (2,58-2,77 нг/мкл), а в жидких ректальных образцах – 2,71 нг/мкл (2,59-2,82 нг/мкл). Существенных различий в концентрации РНК в ротоглотке/глотке и ректальных мазках нет ($p = 0,997$) (Рисунок 1).

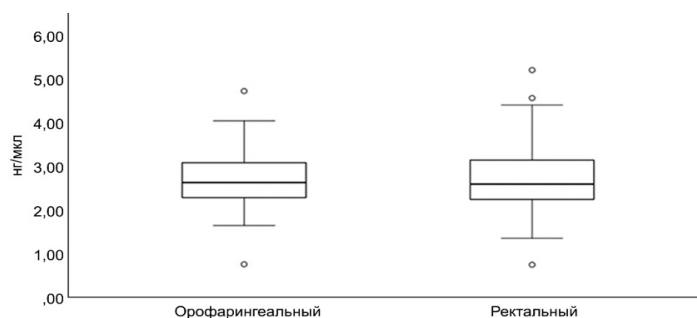


Рисунок 1 – Концентрация РНК (нг/мкл) в орофарингеальных и ректальных мазках летучих мышей

Чувствительность и специфичность панкоронавирусных праймеров

In silico были проведены анализы способности панкоронавирусных праймеров обнаруживать РНК различных типов CoV. В результате было установлено, что использованные вырожденные праймеры из исследования Vijgen и соавт. (2008) позволяют обнаружить по меньшей мере 65 видов CoV из доступных эталонных геномов, принадлежащих к семейству Coronaviridae. Совпадения с другими вирусами отсутствовали, из-за чего специфичность можно принять за 100 %. Большинство несовпадений наблюдалось в прямом праймере — 1 несовпадение с 24,18 % опубликованных геномов CoV и 2 несовпадения с 6,59 % геномов CoV. Было более 2 несовпадений в геномах 3 CoV: Beluga Whale CoV SW1, неопознанного изолята человеческого CoV FT1407-6/2014 и Shrew-CoV/Tibet2014. Филогенетическое древо было построено с использованием 68 полных эталонных геномов видов CoV и одного эталонного генома вируса pEt-SU.

Скрининг CoV у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос

Положительные сигналы РНК CoV были обнаружены в 5 образцах от разных видов летучих мышей: 2 образцов нетопырей Куля, 2 образцов поздних кожанов и 1 образца малой подковообразной летучей мыши. РНК CoV была обнаружена в 4 образцах мазков из ротоглотки и в одном образце мазка из прямой кишки.

Средняя доля обнаруженных CoV в изученной популяции летучих мышей составляет 3,33 % (95 % ДИ 1,1–7,6%). Значимого влияния вида летучих мышей ($\chi^2 = 6,23$, $df = 6$; $p = 0,39$), происхождения мазка ($\chi^2 = 1,83$, $df = 1$; $p = 0,18$), пола ($\chi^2 = 1,38$, $df = 1$; $p = 0,24$) и места сбора проб ($\chi^2 = 2,9$, $df = 3$; $p = 0,4$) на обнаружение РНК CoV не установлено. SARS-подобные CoV не обнаружены.

Результаты контрольного секвенирования образцов с обнаруженной РНК CoV

Секвенирование целевых фрагментов генома SARS-подобных CoV не увенчалось успехом из-за отсутствия ампликонов, но были получены метагеномные данные из образцов, в которых была обнаружена РНК CoV.

Согласно таксономической идентификации необработанных чтений (FASTQ) с помощью Kraken2, было 30 чтений геномов Coronaviridae в данных, полученных в ходе MiSeq, и 54 чтения в данных генома Coronaviridae, полученных в ходе NovaSeq.

Некоторые собранные контиги имели 89–100 % идентичности с CoV, связанными с SARS, и записями HCoV-OC43 из базы данных вирусов NCBI с охватом 3–16 %. Длина этих контигов составляет от 458 до 1236 п.н.

Оценка риска межвидового переноса CoV, выделенных из биоматериала летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос

Ранние исследования показывают, что вспышки SARS, MERS и COVID-19, вероятно, произошли в результате межвидового переноса CoV от летучих мышей через животных, контактирующих с человеком.

На основании вышеперечисленных результатов установлено, что на Европейском Юге России (в Краснодарском крае и Республике Адыгея) обитают летучие мыши, которые являются носителями CoV. Эти животные могут дополнять синантропную фауну.

Для оценки риска передачи CoV проведён анализ, в рамках которого представлены: виды летучих мышей, а также биотические, абиотические и антропогенные факторы для переноса CoV (Таблица 2).

В Краснодарском крае и Республике Адыгея риск передачи CoV от летучих мышей человеку крайне низкий. Также, важно отметить, что в России не зафиксировано случаев передачи CoV от летучих мышей человеку.

Таблица 2 – Анализ факторов переноса CoV в Краснодарском крае и Республике Адыгея

Летучие мыши	Регион	Число образцов биоматериала с РНК CoV	Вид мазка	Продолжительность гиперемии	Климат	Доля пашни и мелиорации
Средиземно морской нетопырь	Республика Адыгея, Краснодарский край	2	орофаринг еальный	≈ 7 месяцев с возможными короткими периодами пробуждения	умеренно-континентальный, горный	≈ 60 %
Поздний кожан	Краснодарский край	2	орофаринг еальный			
Малый подковонос	Республика Адыгея	1	ректальный			

Промутагенная и ДНК-защитная активность молочнокислых и бациллярных бактерий кишечной микробиоты летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос

В исследовании для определения мутагенных и про- или антиоксидантных свойств штаммов, выделенных из микробиоты кишечника летучих мышей, использовали lux-биосенсоры – бактерии *E. coli* MG1655, которым была введена плазмида, содержащая интересующая промотор генов RecA и katG, под контроль которого поместили оперон luxCDABE от бактерии *Photobacterium luminescens*. Мутагенная активность определялась посредством измерения экспрессии RecA, возрастающей при появлении двухнитевых разрывов в ДНК клетки, которые влекут за собой активизацию системы SOS-ответа. Экспрессия katG возрастает в присутствии гидроксильных радикалов.

На рисунке 2 видно, супернатанты многих исследованных бактерий показывают усиление индукции RecA при внесении их одновременно с индуктором повреждения ДНК. При этом сами по себе супернатанты не вызывали достоверного изменения экспрессии RecA.

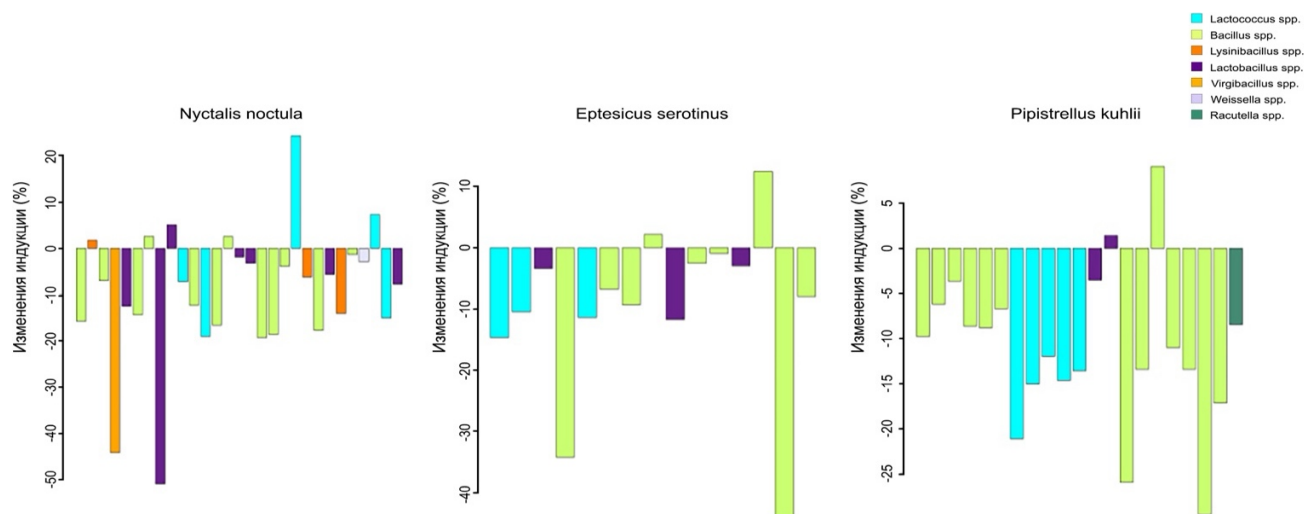


Рисунок 2 – Промутагенная и ДНК-защитная активность *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp*, определенная с помощью ResA-биосенсора *E. coli*. Активность определена относительно диоксида. Легенда столбчатого графика представляет группы штаммов, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии

Lux-биосенсоры показывают не двухцепочечные разрывы в ДНК клетки биосенсора, а только реакцию на них клетки. В норме экспрессия белка ResA находится на низком уровне, промотор ResA, как и другие промоторы белков SOS-ответа, репрессирован белком LexA. При появлении двухнитевых разрывов белок ResA связывается с повреждённой ДНК и образует активированный белок ResA, под воздействием которого белок LexA автокаталитически расщепляется, что приводит к быстрому возрастанию экспрессии ResA и других генов, вовлеченных в SOS-ответ.

Можно предположить, что метаболиты кишечных бактерий летучих мышей способны усиливать сродство ResA к одноцепочечной ДНК, либо взаимодействовать с LexA, ускоряя его автокатализ.

У эукариот известна система гомологичной репарации двухцепочечных разрывов, важную роль в регуляции которой играет белок RAD51. При этом белок RAD51 гомологичен и во многом похож на ResA. Таким образом, вероятно, что действие метаболитов кишечной микробиоты может увеличить не только SOS-ответ бактерий, но и процессы, протекающие в эукариотических клетках хозяина.

Про- и антиоксидантная активность молочнокислых и бациллярных бактерий кишечной микробиоты у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан и малый подковонос, обитающих на территориях Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, Республики Адыгея

На рисунке 3 видно, значительное число бактерий, выделенных из исследованных летучих мышей, имело высокую степень антиоксидантной активности.

Можно предположить, что бактериальная микробиота кишечника летучих мышей способна, за счет выработки вторичных антиоксидантных метаболитов, в некоторой степени нивелировать влияние свободных радикалов на клетки летучих мышей.

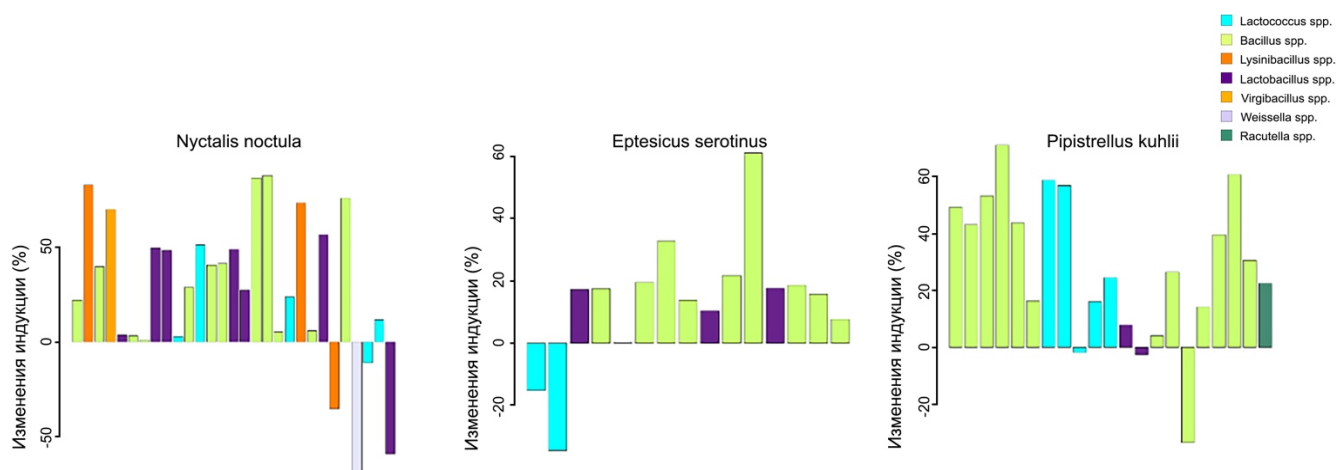


Рисунок 3 – Про- и антиоксидантная активность *Lactococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Virgibacillus spp.*, *Weissella spp.*, *Raoultella spp.*, определенная с помощью Кат-биосенсора *E. coli*. Активность определена относительно перекиси водорода. Легенда столбчатого графика представляет группы штаммов, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии

Биомолекулярная дифференциация и идентификация бактериальных изолятов *E. faecium*

При помощи Рер-ПЦР в 6 выбранных изолятах, представляющих потенциал для производства бактериоцинов, были обнаружены две группы (Рисунок 4).

В первой группе (кластер 1) 5 изолятов (ST01TL, ST10TL, ST77TL, ST85TL и ST122TL) показали одинаковый профиль как копию одного и того же штамма, выделенного многократно; во второй группе (кластер 2) – только один изолят (изолят ST76TL). Несмотря на то, что пять изолятов в кластере 1 были получены от разных летучих мышей, все летучие мыши содержались в одном ареале. Это наблюдение предполагает потенциальный обмен бактериями и вирусами между совместно содержащимися животными, обусловленный общей средой и тесным контактом друг с другом.

Секвенирование гена 16s рРНК в дополнение к биохимическим, физиологическим и морфологическим тестам позволило идентифицировать все 6 предварительно отобранных изолятов как сгруппированные в два кластера *Enterococcus faecium*. Также 5 из 6 предварительно отобранных изолятов представляют один и тот же профиль Рер-ПЦР, только 1 из них (ST01TL) был выбран для дальнейших исследований в дополнение к уникальному представителю кластера 2 (ST76TL).

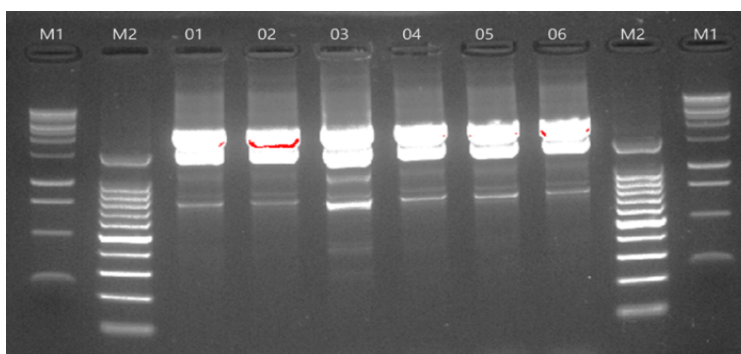


Рисунок 4 – Фрагменты ДНК, полученные после Рер-ПЦР геномной ДНК. Линии 01-06: изоляты из образцов фекалий летучих мышей, предварительно идентифицированные *Enterococcus spp.* Линии M1 и M2, молекулярные лестницы длиной 1 т.п.н. и 100 п.н. (фрагменты).

Антимикробные свойства штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL при воздействии температуры, pH и выбранных химикатов

Антимикробные свойства, полученные из супернатанта от *E. faecium* ST01TL и ST76TL, были оценены после воздействия протеиназы К при различных температурах, диапазонах pH и под воздействием различных химических веществ (Таблица 3). Полная потеря антимикробной активности наблюдалась после воздействия протеиназы К на супернатант обоих штаммов, что указывает на белковую природу веществ, продуцируемых *E. faecium* ST01TL и ST76TL.

Таблица 3 – Влияние химических веществ, температуры и pH на стабильность бактериоцинов, продуцируемых штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Химические вещества/условия	ST01TL			ST76TL		
	<i>L. monocytogenes</i>					
	422	603	620	422	603	620
Химические вещества: NaCl, додецилсульфат натрия, Полисорбат-20, Полисорбат-80 и молоко (1%)	+	+	+	+	+	+
Температура: 8, 30, 37, 40, 60, 80 °C в течение 60 минут	+	+	+	+	+	+
Температура 100°C в течение 60 минут	-	-	+	-	-	+
Температура 121°C в течение 15 минут	-	-	+	-	-	+
pH: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 и 10.0 в течение 60 минут	+	+	+	+	+	+
Контроль	+	+	+	+	+	+

Мониторинг роста бактериоциногенных штаммов *E. faecium*, продукция антимикробных пептидов и изменение pH

Изменения в росте бактерий сопровождались изменениями мутности культуры *E. faecium* ST01TL и ST76TL в MRS при 37 °C. Штаммы имели похожие паттерны роста, где максимальная OD 600 нм увеличилась примерно до 3,84 (зарегистрированная OD была рассчитана на основе примененных уровней разбавлений и зарегистрированных значений для исследуемых образцов), соответственно, зарегистрированных через 21 ч и 27 ч, для *E. faecium* ST01TL и ST76TL из процесса ферментации. В период ферментации pH снизился с 6,31 до 3,94 для *E. faecium* ST01TL и с 6,37 до 4,08 для *E. faecium* ST76TL.

Более того, активность бактериоцина, протестированная с *L. monocytogenes* 620, поднялась до 12800 у.е./мл для *E. faecium* ST01TL через 21 ч, и 25600 у.е./мл для *E. faecium* ST76TL через 24 ч. Подобные результаты были получены при проведении тестов с *L. monocytogenes* 422 и 603 (в обоих случаях снижение активности бактериоцина было зафиксировано в конце периода ферментации 24 ч (Рисунок 5)).

Полученные результаты динамики роста и продукции бактериоцина с различными штаммами *Enterococcus spp.* совпадают с существующими данными, однако в исследованиях, описанных ранее, отмечалось, что бактериоцины, продуцируемые *Enterococcus*, были стабильны в период ферментации 24–48 ч.

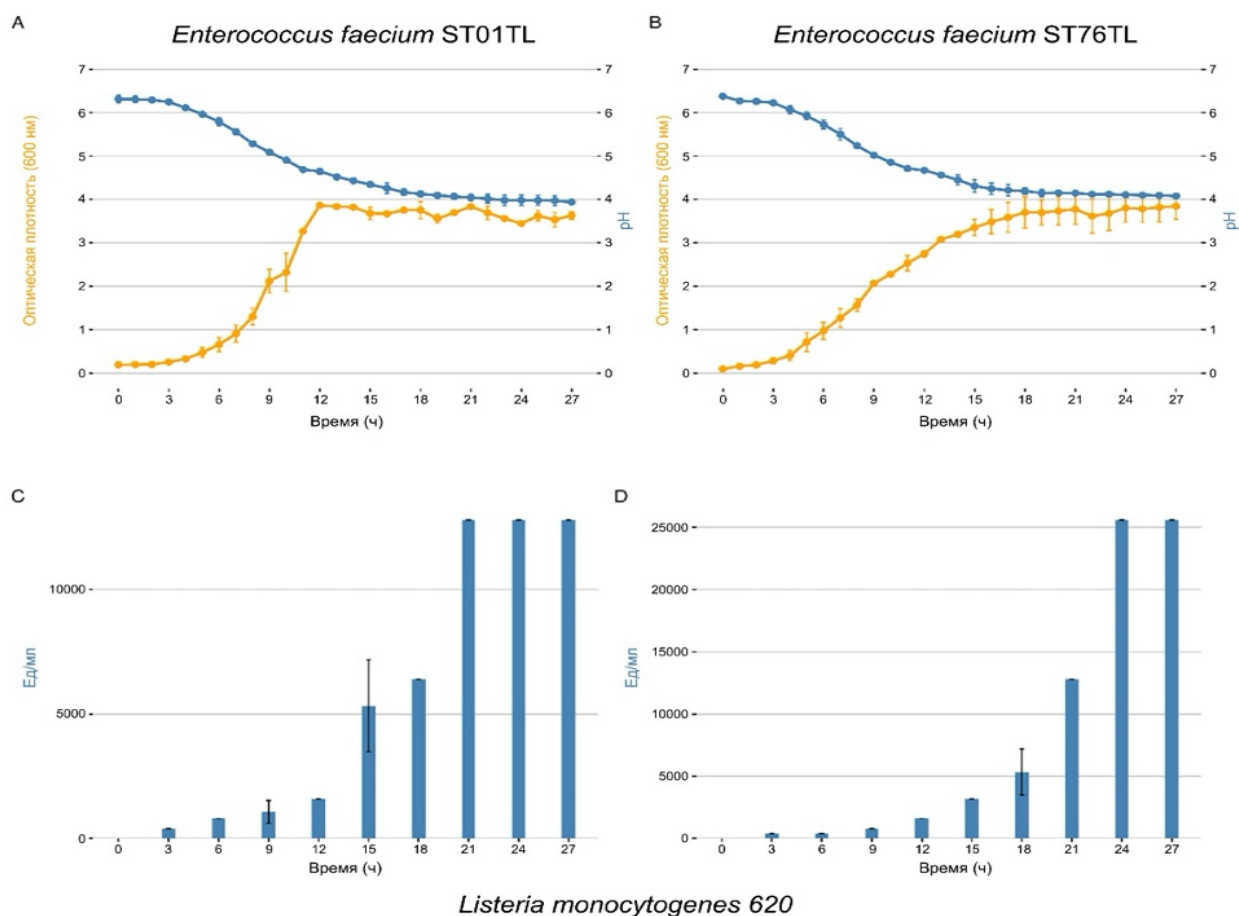


Рисунок 5 – Бактериальный рост *E. faecium* ST01TL и ST76TL в MRS, подкисление и продукция бактериоцинов исследуемыми штаммами с зарегистрированной активностью по сравнению с *L. monocytogenes* 620

Действие бактериоциногенных штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL на *L. monocytogenes*. Оценка активности бактериоцинов

Ингибирование роста штаммов *L. monocytogenes* 422, 603, 620 наблюдалось после добавления супернатанта, содержащего бактериоцин ST01TL и ST76TL. В экспериментальной установке было добавлено 12800 у.е./мл в раннюю логарифмическую фазу (через 3 ч после инокуляции) *L. monocytogenes* 422, 603, 620, результаты роста ингибиции наблюдали в течение 9 ч. Рост *L. monocytogenes* 422, 603, 620 без добавления бактериоцина служил контролем (Рисунок 6). Также образцы, полученные через 10 ч из экспериментальных и контрольной установок, не выявили присутствия *L. monocytogenes*, число жизнеспособных особей ($\log 8,23$ КОЕ/мл) при тестировании в чашках Петри (питательная среда Palcam) и культивировании в течении 48 ч при 37 °C. Полученные данные совпадают с аналогичными наблюдениями при оценке различных энтероцинов.

Бактериоцины, продуцируемые *E. faecium* ST01TL и ST76TL, показали высокую ингибирующую активность по отношению к *L. monocytogenes*. Однако бактериоцины, продуцируемые *E. faecium* ST01TL и ST76TL, показали очень узкий спектр активности по отношению к грамотрицательным тестируемым организмам.

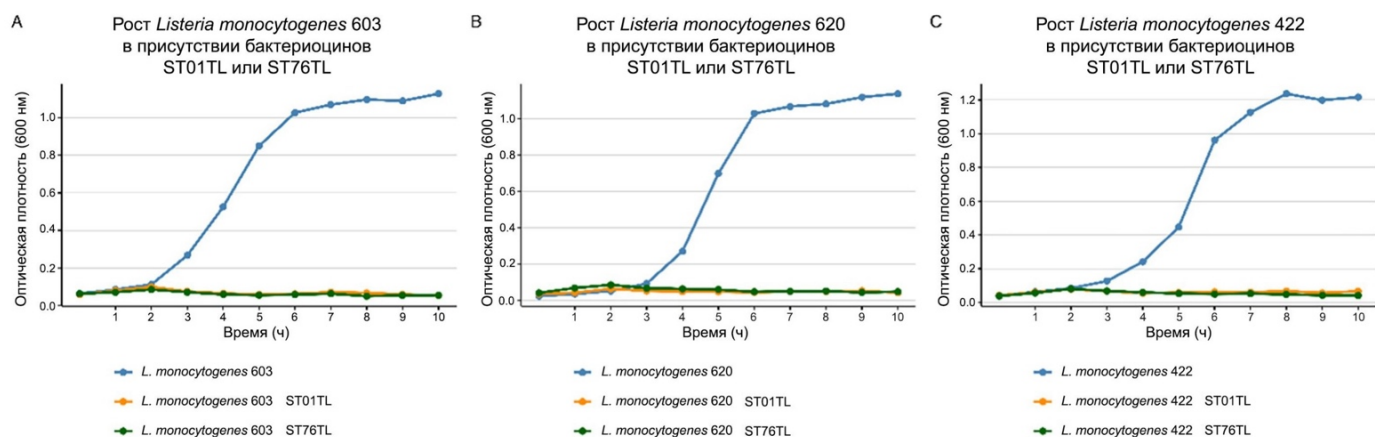


Рисунок 6 – Эффект продукции бактериоцинов из *E. faecium* ST01TL и ST76TL. Контролем служил рост микроорганизмов без добавления бактериоцинов

Устойчивость к антибактериальным и противомикробным препаратам штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Данные об устойчивости *E. faecium* ST01TL и ST76TL (Таблица 4) позволяют предположить их полирезистентность.

Таблица 4 – Устойчивость к антибактериальным и противомикробным препаратам штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL с помощью метода диско-диффузии (жирным шрифтом выделены антибактериальные препараты, рекомендованные Европейским агентством по безопасности продуктов питания). Высокая чувствительность – 25 мм и более. Низкая чувствительность – менее 10 мм

Антибактериальные и противомикробные препараты мг/диск	ST01TL	ST76TL
Ампициллин, 10	21	30
Хлорамфеникол, 30, Флорфеникол, 30	26	25
Эритромицин, 15, Линезолид, 30	26	26
Гентамицин, 10	18	0
Канамицин, 30, Цефтриаксон, 30	20	0
Тетрациклин, 30	30	30
Ванкомицин, 30	0	20
Амикацин, 30	7	0
Амоксициллин + клавулановая кислота, 30	30	25
Ампициллин + сульбактам, 20	28	0
Азитромицин, 15	20	14
Ципрофлоксацин, 5	20	20
Кларитромицин, 15	23	24
Энрофлоксацин, 5	20	18
Имипенем, 10	0	24
Левифлоксацин, 5	20	20
Моксифлоксацин, 5	25	24
Нитрофурантоин, 300	26	24
Офлоксацин, 5	18	15
Пефлоксацин, 5	0	10
Тилозин, 60	21	21
Клиндамицин, 2, Стрептомицин, 10, Цефепим, 30; Цефтиофур, 30; Цефуроксим, 3; Ко-тримоксазол, 25; Метронидазол, 50; Налидиксовая кислота, 30; Неомицин, 10; Оксациллин, 1; Тобрамицин, 10; Триметоприм, 5	0	0

Оценка других свойств штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Бактериальные клетки, имеющие высокую гидрофобность, образуют прочные взаимодействия с клетками слизистой оболочки. Значения гидрофобности *E. faecium* ST01TL и ST76TL были 34,55 % и 41,51 % (Рисунок 7). Данные значения выше, чем у *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (55 %), известного пробиотического штамма. Есть предположение, что гидрофобность может способствовать адгезии, но не является предпосылкой. Более того, гидрофобные взаимодействия могут способствовать образованию биопленок, повышая устойчивость ЖКТ и улучшая защитную среду.

Штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL продуцировали: эстеразу (С 8), липазу (С 14), валин ариламидазу, цистин ариламидазу, трипсин, нафтол-AS-BI-фосфогидролазу и альфа-галактозидазу с некоторыми специфическими вариациями.

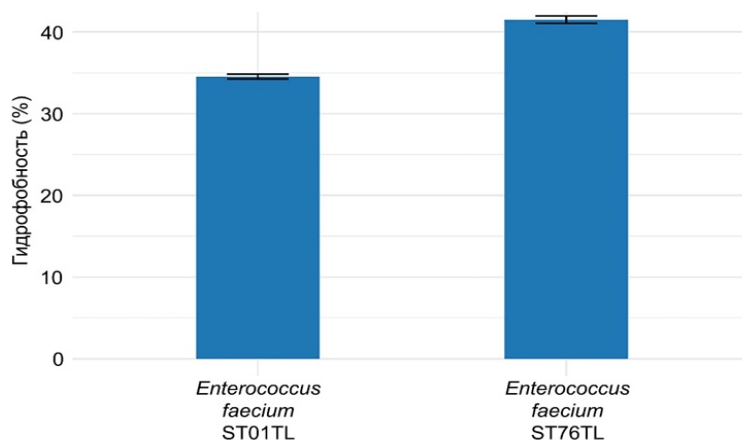


Рисунок 7 – Гидрофобность штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Полученные продукты метаболизма штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL могут способствовать усвоению жирных кислот, которые играют важную роль для синтеза мембран и других клеточных процессов. Активность эстеразы (С 8) способствует штамму *E. faecium* ST01TL и ST76TL образовывать биопленки. Липаза (С 14) играет роль в адаптации и выживании *E. faecium* в липидных средах, таких как ЖКТ. Существует предположение, что липолитическая активность липазы (С 14) связана с выработкой биоактивных соединений, которые могут подавлять рост конкурирующих микроорганизмов, способствуя доминированию *E. faecium*. Валин ариламидаза связана с протеолитической активностью *E. faecium*. Цистин ариламидаза отвечает за рост бактерий. Нафтол-AS-BI-фосфогидролаза участвует в гидролизе фосфатных эфиров и помогает в расщеплении нафтол-AS-BI-фосфата на нафтанол-AS-BI и неорганический фосфат, для синтеза нуклеотидов. Альфа-галактозидаза участвует в гидролизе альфа-галактозидных связей в галактоолигосахаридах и полисахаридах, активно участвует в расщеплении сложных углеводов на простые сахара, которые легче усваиваются в ЖКТ.

Результаты скрининга на наличие искомых генов в ДНК исследуемых штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL

Биомолекулярный скрининг на наличие генов вирулентности показал, что *E. faecium* ST01TL и ST76TL не имеют генов, связанных с высокой патогенностью или устойчивостью к ванкомицину. Однако, наличие генов *gelE* (кодирующих секретируемую Zn-металлопротеазу у *E. faecalis* и других энтерококков, связанную с дегидратацией фибрина и способствующую процессам инфицирования хозяина) и *ase* (кодирующего белки, связанного со свойствами адгезии у *E. faecalis*), было выявлено у обоих штаммов, в отличие от гена *asa* (кодирующего субстрат агрегации), который был обнаружен только у штамма *E. faecium* ST76TL.

Согласно данным проведенного ПЦР-скрининга, штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL содержат ген *gad*, влияющий на продукцию γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Ген *enterocin P*, ассоциированный с продукцией бактериоцинов, был выделен в ДНК *E. faecium* ST76TL. Свойства, выделенные от некоторых генов, полученные из штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL, говорят о том, что их можно использовать для пробиотических препаратов. Также наличие данных генов могло благоприятно влиять на здоровье летучих мышей, из фекалий которых выделены данные штаммы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доля обнаруженных CoV в изученной популяции 150 летучих мышей составила 3,33 % (95 % ДИ 1,1–7,6). CoV были обнаружены в 5 образцах из 300 мазков (4 орофарингеальных мазка и 1 ректальный мазок).

Концентрация РНК, вероятно, была низкой для эффективной сборки геномов CoV и их аннотации. Метагеномный NGS-анализ всех образцов с положительным результатом кПЦР обнаружил считывания *Бетакоронавируса* с помощью инструмента таксономической идентификации, которые не связаны с SARS.

Метаболиты кишечных бактерий *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp*, выделенные из ректальных мазков исследованных летучих мышей, имели антиоксидантную и промутагенную активность.

Свойства, полученные из штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL, могут, ввиду образования биопленок, повышать устойчивость клеток кишечника летучих мышей к CoV. При этом штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL являются довольно устойчивыми к физическим и химическим факторам, а также не обладают факторами патогенности.

Таким образом, можно утверждать, что метаболиты кишечной микробиоты летучих мышей способствует формированию, с одной стороны, местного иммунитета кишечника летучих мышей, а с другой – промутагенных условий для появления эмерджентных CoV и их дальнейшего выделения в окружающую среду. Более того, летучие мыши, обитающие в одном ареале, имеют способность к горизонтальной передаче бактерий. Из-за этого возможно формирование однородной бактериальной микробиоты кишечника среди колонии летучих мышей, что потенцирует их общую устойчивость к CoV.

Риск передачи CoV инфекции от летучих мышей другим животным или человеку остается стохастическим, так как возможны различные по вирулентности и устойчивости во внешней среде свойства новых штаммов CoV рода *Бетакоронавирус*. При этом мониторинг CoV у летучих мышей на больших территориях является трудозатратным и экономически нецелесообразным из-за сложности сбора биоматериала, влияния сезонности, проведения молекулярно-генетических исследований, потенциального нарушения колоний летучих мышей.

ВЫВОДЫ

1. Не выявлено различий в концентрации РНК CoV в мазках из ротоглотки и прямой кишки. Не установлено влияния вида летучих мышей, происхождения мазка, пола или места сбора образцов на обнаружение РНК CoV.
2. Установлена превалентность CoV в 3,3 % у исследуемых летучих мышей на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея в период сбора биоматериала. CoV обнаружены у летучих мышей видов средиземноморский нетопырь (2 самца), поздний кожан (самец и самка), малый подковонос (самка), обитающих в Краснодарском крае и в Республике Адыгея при проведении кПЦР (HRM-анализа) с использованием панкоронавирусного праймера.
3. Метагеномным исследованием с применением секвенирования обнаружены участки *Бетакоронавируса* с помощью таксономической идентификации у CoV среди летучих

мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, обитающих в Краснодарском крае и в Республике Адыгея. Таким образом, обнаруженные CoV могут являться потенциальными возбудителями CoV инфекций животных и человека.

4. Не обнаружено SARS-подобных CoV среди летучих мышей видов средиземноморский нетопырь, поздний кожан, малый подковонос, обитающих в Краснодарском крае и в Республике Адыгея.

5. Установлено, что метаболиты кишечных бактерий *Lactococcus spp*, *Bacillus spp*, *Lysinibacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Virgibacillus spp*, *Weissella spp*, *Raoultella spp* у исследуемых летучих мышей участвуют в формировании их устойчивости к CoV, так как активируют антиоксидантные и ДНК-репаративные реакции в клетках летучих мышей, но также способствуют и мутациям CoV.

6. Выявлено, что штаммы *E. faecium* ST01TL и ST76TL способны за счёт синтеза бактериоцинов и образования биоплёнок нивелировать патогенные факторы CoV, что, вероятно, ассоциировано с неманифестными формами CoV инфекции у летучих мышей.

7. Расширен инструментарий ветеринарно-санитарного мониторинга CoV у летучих мышей. Полученные данные о распространённости CoV у исследуемых летучих мышей на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея не позволяют разработать целевые противоэпизоотические меры, ввиду обнаруженной промутагенной активности микробиот-зависимых метаболитов, а также способностью бактериоциногенными штаммами *E. faecium* ST01TL и ST76TL формировать местный иммунитет кишечника у летучих мышей как фактора их устойчивости к CoV, что создаёт условия для переноса CoV инфекции в окружающей среде.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для получения более высокой концентрации РНК CoV и достоверных данных об особенностях CoV инфекции необходимо исследовать не только орофарингеальные и ректальные мазки летучих мышей, но и отбирать образцы тканей, мочи, фекалий.

2. С целью характеристики ранее неизвестных геномов CoV у летучих мышей следует использовать вырожденные пары праймеров и в качестве основного метода – метагеномный NGS-анализ, а также капиллярное секвенирование амплифицированных генов CoV.

3. Проведение целевых противоэпизоотических мер в отношении CoV у летучих мышей на территории Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краёв, в Республике Адыгея нецелесообразно ввиду неопределяемого риска их межвидовой передачи и потенциального нарушения колоний летучих мышей.

ПЕРСПЕКТИВНЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В рамках диссертационной работы были изучены особенности бактериальной микробиоты летучих мышей и её возможное влияние на носительство CoV потенциально патогенных для животных и человека.

Для последующего изучения CoV у летучих мышей в качестве биоматериала необходимо отбирать, помимо ректальных, орофарингеальных мазков и образцов кала, дополнительно: кровь, мочу, образцы тканей в скученных поселениях летучих мышей, поскольку в подобных случаях вероятность выделения CoV будет выше. Это позволит получить наиболее точные данные о тропизме CoV и особенностях инфекционного процесса у летучих мышей.

Возможно изучение бактериоциногенных штаммов *E. faecium* ST01TL и ST76TL в качестве пробиотиков в аспекте формирования ими местного иммунитета у летучих мышей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и приравненные к ним

1. Detection of coronaviruses in insectivorous bats of Fore-Caucasus, 2021 / Ig.V. Popov, O.V. Ohlopkova, I.M. Donnik, P.V. Zolotukhin, A. Umanets, S.N. Golovin, A.V. Malinovkin, A.A. Belanova, P.V. Lipilkin, **T.A. Lipilkina** et al. // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13, N. 2306. – P. 1-12. (Q1).
2. Gut microbiota composition of insectivorous synanthropic and fructivorous zoo bats: a direct metagenomic comparison / I.V. Popov, Il.V. Popov, A.A. Krikunova, **T.A. Lipilkina** et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, N. 24. – P. 1-15. (Q2).
3. Определение состава кишечной микробиоты рыжей вечерницы посредством бактериологического анализа и высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК / И.В. Попов, И.М. Донник, **T.A. Липилкина**, И.С. Березинская, Е.В. Ткачева, Е.А. Лукбанова, А.В. Аленушкина, Ю.А. Тихменева, Т.Н. Дерезина, А.П. Евсюков, Т.И. Твердохлебова, А.М. Ермаков // Микробиология. – 2024. – Т. 93, №6. – С. 864 - 869. (Q4).
4. Beneficial Properties of Enterococcus faecium Strains Isolated From Bats' Fecal Samples / **T.A. Lipilkina**, M.V. Alves, K.O. Carneiro, K. Leani, Ig.V. Popov, Il.V. Popov, M.L. Chikindas, A.M. Ermakov, S.D. Todorov // Molecular Nutrition & Food Research – 2025. – Vol. 69, N. 24. – P. 1-18. (Q1).

Работы, опубликованные в прочих изданиях

5. Feline coronavirus infection / **T.A. Lipilkina**, I.V. Popov, P.V. Lipilkin, A.M. Ermakov // E3S Web Conf. Rostov-on-Don, Russia, 24-26 February 2021. – Vol. 273. Article 02025. – P. 1-10.
6. Coronaviruses of synanthropic bats: an unexplored threat / **T.A. Lipilkina**, Il.V. Popov, K. Kitsenko, Ig.V. Popov A.M. Ermakov // E3S Web Conf. Rostov-on-Don, Russia, 25-27 May 2022. – Vol. 363. Article 04018. – P. 1-6.
7. Синантропные и домашние животные как резервуар коронавирусов / **T.A. Липилкина**, С.Г. Головин, И.В. Попов, П.В. Липилкин, А.М. Ермаков // Ветеринария Кубани. – 2022. – № 2. – С. 3-7.
8. Bacteriocinogenic properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from bats fecal samples / **T.A. Lipilkina**, M.V. Alves, K.O. Carneiro, K. Leani, Ig.V. Popov, Il.V. Popov, M.L. Chikindas, A.M. Ermakov, S.D. Todorov// Yakult International Symposia on Beneficial Microbes. Sao Paulo, Brazil, 27-28 March, 2025. Book of Abstract. PP042. – P. 92-94.
9. Safety and beneficial properties of bacteriocinogenic and putative probiotic strain *Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a./ **T.A. Lipilkina**, C. Xu, M. de Souza Barbosa, V.N. Khramova, S.K. Shebeko, A.M. Ermakov, I.V. Ivanova, S.D. Todorov // Yakult International Symposia on Beneficial Microbes. Sao Paulo, Brazil, 27-28 March, 2025. Book of Abstract. PP042. – P. 90-91.
10. Риски межвидовой передачи коронавирусной инфекции от летучих мышей и кошек человеку / **T.A. Липилкина**, Р.Г. Новиков, С.В. Сидоров, М.Ю. Вакуленко // 79-я Итоговая научная конференция. Ростов-на-Дону, Россия, 17-18 апреля, 2025. – С. 124-126.
11. Bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Bats Fecal Samples, Beneficial or Hazard? / **T.A. Lipilkina**, A. M. Vinicio, C. K. Ordonho, K. Leani, Ig.V. Popov, Il.V. Popov, M.L. Chikindas, A.M. Ermakov, S.D. Todorov// IPC2025. Athens, Greece, 24-26 June, 2025. – P. 174.