

# Сравнение и оптимизация методов оценки антагонистической активности штаммов пробиотиков нового поколения

О.А.Игнатьева<sup>1</sup>, М.А.Волков<sup>1</sup>, М.Н.Панькова<sup>1</sup>, З.Е.Федец<sup>1</sup>, А.В.Загайнова<sup>1</sup>, Д.Ю.Побережный<sup>1</sup>, В.В.Даниэль<sup>1</sup>, В.В.Макаров<sup>1</sup>, В.В.Муравьева<sup>2</sup>, А.Б.Гордеев<sup>2</sup>, Т.В.Припутневич<sup>2</sup>, В.С.Юдин<sup>1</sup>, А.А.Кескинов<sup>1</sup>, Д.А.Каштанова<sup>1</sup>, С.М.Юдин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

В последнее время значительный интерес исследователей направлен в сторону изучения микробиома и его роли для здоровья человека. Установлено, что многие патологические состояния ассоциированы с изменениями в профиле микробных сообществ, населяющих различные биотопы в нашем организме. Следовательно, весьма перспективным представляется использование пробиотических препаратов для предотвращения и коррекции различных заболеваний. Однако перед исследователями возникает достаточно сложная задача отбора наиболее перспективных штаммов и их комбинаций, обладающих максимальным терапевтическим потенциалом. Для скрининга и последующего отбора наиболее эффективных штаммов часто применяется оценка их антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Этот подход позволяет сузить круг поиска и выбрать для дальнейшей работы лишь наиболее подходящие изоляты. Крайне важным является выбор метода анализа антагонизма, поскольку важно учитывать специфические особенности тестируемых изолятов, и не все доступные на сегодняшний день методики будут подходящими в каждом конкретном случае.

**Целью** данного исследования было сравнение нескольких методов оценки антагонистической активности на примере взаимодействия двух микроорганизмов – *Akkermansia muciniphila* и *Klebsiella pneumoniae*.

**Материалы и методы.** Для оценки антагонистической активности мы протестировали методы перпендикулярных штрихов, агаровых блоков, совместного культивирования на одной питательной среде, метод перевернутого агара, а также метод двухслойного агара.

**Результаты.** При использовании методик перпендикулярных штрихов и агаровых блоков нам не удалось обнаружить зон ограничения роста *K. pneumoniae*. Однако результаты экспериментов с применением совместного культивирования на одной питательной среде, а также методы перевернутого агара и двухслойного агара однозначно свидетельствовали о наличии антагонистической активности *A. muciniphila* в отношении *K. pneumoniae*. Вероятно, это связано с умеренным антагонистическим потенциалом исследуемого пробиотического микроорганизма, который невозможно зафиксировать с помощью техник, предполагающих лишь ограниченный контакт между тестируемыми штаммами. На наш взгляд, оптимальными способами выявления антагонизма в случае изучения *A. muciniphila* и, по всей вероятности, многих других пробиотических штаммов являются метод совместного культивирования и метод перевернутого агара. Именно эти методики в наших экспериментах продемонстрировали угнетение роста *K. pneumoniae* на средах с *A. muciniphila*, чего не удалось зафиксировать методами перпендикулярных штрихов и агаровых блоков.

**Заключение.** Мы предполагаем, что метод совместного культивирования и метод перевернутого агара подойдут для оценки антагонизма и других штаммов пробиотиков нового поколения со схожими свойствами.

**Ключевые слова:** пробиотики нового поколения, *Akkermansia muciniphila*, антагонизм, *Klebsiella pneumoniae*

**Для цитирования:** Игнатьева О.А., Волков М.А., Панькова М.Н., Федец З.Е., Загайнова А.В., Побережный Д.Ю., Даниэль В.В., Макаров В.В., Муравьева В.В., Гордеев А.Б., Припутневич Т.В., Юдин В.С., Кескинов А.А., Каштанова Д.А., Юдин С.М. Сравнение и оптимизация методов оценки антагонистической активности штаммов пробиотиков нового поколения. Бактериология. 2026; 11(1): 61–71. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-1-61-71

## Comparison and optimization of methods for the assessment of antagonistic activity of next-generation probiotic strains

О.А.Игнатьева<sup>1</sup>, М.А.Волков<sup>1</sup>, М.Н.Панькова<sup>1</sup>, З.Е.Федец<sup>1</sup>, А.В.Загайнова<sup>1</sup>, Д.Ю.Побережный<sup>1</sup>, В.В.Даниэль<sup>1</sup>, В.В.Макаров<sup>1</sup>, В.В.Муравьева<sup>2</sup>, А.Б.Гордеев<sup>2</sup>, Т.В.Припутневич<sup>2</sup>, В.С.Юдин<sup>1</sup>, А.А.Кескинов<sup>1</sup>, Д.А.Каштанова<sup>1</sup>, С.М.Юдин<sup>1</sup>

### Для корреспонденции:

Игнатьева Ольга Андреевна, кандидат биологических наук, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1  
E-mail: olgnatieva@cspfmba.ru  
ORCID: 0000-0003-2020-4206

Статья поступила 21.10.2025, принята к печати 30.03.2026

### For correspondence:

Olga A. Ignatyeva, PhD in Biological Sciences, analyst in the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency

Address: bld 1, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russian Federation  
E-mail: olgnatieva@cspfmba.ru  
ORCID: 0000-0003-2020-4206

The article was received 21.10.2025, accepted for publication 30.03.2026

<sup>1</sup>Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

The microbiome and its role in human health have been a significant area of focus. Changes in microbial communities inhabiting various biotopes in the body have been linked to numerous pathological processes. Therefore, the use of probiotics may be an advantageous approach to preventing and managing various diseases and conditions. However, the task of identifying the most effective strains and their optimal combinations, which deliver the greatest therapeutic benefits, presents certain challenges. One way of assessing the therapeutic potential of probiotics involves assessing the antagonistic activity of these strains against pathogenic and opportunistic microorganisms. This strategy helps to streamline the search process and facilitates the selection of the most suitable isolates for further investigation. It is critical to choose the appropriate techniques for assessing antagonistic properties, taking into consideration the specific characteristics of the isolates under examination, as not all available methods are suitable for this purpose. This approach narrows down the scope for search and helps select the most suitable isolates for further research. Choosing the most appropriate technique for assessing antagonistic properties is crucial, as it is essential to factor in the specific properties of the isolates being tested. Not all currently available techniques are suitable for this purpose.

**Aim.** This study aimed at comparing several techniques of assessing the antagonistic properties using two microorganisms, *Akkermansia muciniphila* and *Klebsiella pneumoniae*.

**Materials and methods.** The following techniques were tested: cross-streak method, agar blocks, co-cultivation on the same nutrient medium, inverted agar, and two-layer agar.

**Results.** Co-cultivation and the inverted agar were found to be the best techniques for assessing the antagonistic activity of probiotic strains. With these two methods, the growth of *K. pneumoniae* was inhibited on *A. muciniphila*-containing media, which could not be achieved by using the cross-streak method or agar blocks.

**Conclusion.** We hypothesize that the co-cultivation and inverted agar techniques could also be suitable for assessing the antagonistic activity of other next-generation probiotic strains with similar properties.

**Key words:** next-generation probiotics, *Akkermansia muciniphila*, antagonism, *Klebsiella pneumoniae*

**For citation:** Ignatyeva O.A., Volkov M.A., Pankova M.N., Fedets Z.E., Zagainova A.V., Poberezhniy D.Yu., Daniel V.V., Makarov V.V., Muravieva V.V., Gordeev A.B., Pripitnevich T.V., Yudin V.S., Keskinov A.A., Kashtanova D.A., Yudin S.M. Comparison and optimization of methods for the assessment of antagonistic activity of next-generation probiotic strains. Bacteriology. 2026; 11(1): 61–71. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-1-61-71

На сегодняшний день растущее внимание многих исследователей приковано к микробиоте человека, поскольку по мере развития науки в этой области мы все больше осознаем чрезвычайную важность населяющих наш организм микроорганизмов-комменсалов для здоровья всех органов и систем. Симбионты образуют крайне сложно организованные, саморегулируемые и относительно стабильные сообщества, включающие в себя сотни и тысячи различных видов бактерий, вирусов, грибов и архей [1, 2]. Сформировавшись в процессе длительной коэволюции, микроорганизмы способны не только успешно сосуществовать внутри этих сообществ, но и приносить значительную пользу организму-хозяину, участвуя в процессе пищеварения [3, 4], поддержании здоровья пищеварительного и дыхательного трактов [5, 6], оказывая значительное влияние на метаболизм [7], модулируя работу иммунной системы [8], обеспечивая защиту от патогенов [9].

В последнее время достоверно установлено, что дестабилизация микробиоты происходит при самых разных патологиях [10], и поэтому особо перспективными сейчас представляются исследования различных способов модуляции, корректировки микробных сообществ с помощью пробиотических препаратов. До недавнего времени в качестве таковых традиционно рассматривались несколько видов лакто- и бифидобактерий, однако в последнее время интерес микробиологов все больше смещается в сторону менее изученных, но, вероятно, не менее перспективных культур пробиотиков нового поколения, таких как *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis* и др. В данном контексте актуализируются вопросы поиска перспективных штаммов пробиотических культур, оценки и сравнения их

эффективности и подбора наиболее активных комбинаций микроорганизмов, которые способны к синергии.

При наличии многих штаммов-кандидатов проверка их эффективности на животных моделях может оказаться весьма затруднительной из-за сложности, высокой стоимости и этических соображений. Необходим некий скрининговый метод, который позволил бы сузить круг поиска и из множества изолятов, потенциально обладающих пробиотическими свойствами, отбирать лишь наиболее перспективные, а уже на следующем этапе переходить к их изучению на эукариотических клетках и в животных моделях. В качестве такого метода вполне можно рассматривать оценку антагонистической активности. Многие из населяющих нас комменсалов способны проявлять бактериостатическую и даже бактерицидную активность в отношении широкого спектра микроорганизмов. Это достигается преимущественно за счет синтеза различных активных метаболитов, способных ингибировать рост других бактерий. Сюда относятся, к примеру, бактериоцины – специфические бактериальные пептиды с выраженной антимикробной активностью, различные органические кислоты, спирты, перекиси, хорошо знакомый лизоцим [11]. Оценка антагонистической активности штаммов-кандидатов часто применяют именно для скрининга, поскольку это относительно простой, быстрый и недорогой метод. Кроме того, изучение антагонизма может помочь в создании комбинированных пробиотиков, поскольку при этом необходимо учитывать взаимоотношения микроорганизмов в их составе. И, наконец, исследования антагонистической активности могут лежать в основе поиска новых антимикробных препаратов, что особенно актуально в свете постоянно растущей антибиотикорезистентности патогенов.

Однако перед исследователем всегда встает вопрос: какой метод лучше использовать для оценки антагонизма? На сегодняшний день описано множество различных методов и их вариаций, и далеко не всегда они дают стабильные результаты [12].

**Целью** данной работы было на примере взаимодействия двух микроорганизмов – *Akkermansia muciniphila* и *Klebsiella pneumoniae* – провести сравнение нескольких широко используемых методов оценки антагонистической активности с целью выбора оптимального (оптимальных), который наилучшим образом подходит для тестирования штаммов пробиотиков нового поколения.

## Материалы и методы

### Штаммы микроорганизмов и условия культивирования

В качестве пробиотического микроорганизма использовали штамм *A. muciniphila*, полученный из кала здоровой женщины в микробиологической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России.

В качестве тест-культуры выбран штамм *K. pneumoniae* ATCC 700603 (взят из архива ФГБУ «ЦСП» ФМБА России), поскольку данный микроорганизм, во-первых, может расти как в аэробных, так и в анаэробных условиях, а во-вторых, неприхотлив и дает быстрый рост на разных питательных средах, в т.ч. и подходящих для *A. muciniphila*, что упрощает и создает больший простор для экспериментов по их совместному культивированию и изучению антагонизма.

В одном из экспериментов также использовали штамм *Roseburia faecis* (взят из архива ФГБУ «ЦСП» ФМБА России) в качестве тест-культуры вместо *K. pneumoniae* для того, чтобы проверить обеднение питательной среды при оценке метода перевернутого агара.

Для культивирования штаммов использовали агаровую среду Шедлера (АШ) (HiMedia, Индия) и мясопептонный агар (МПА) (ООО «НПЦ Химикон», Россия). Культивирование проводилось как в аэробных, так и в строго анаэробных условиях в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси ( $N_2$  – 80%;  $CO_2$  – 10%;  $H_2$  – 10%) в анаэробной станции Vactron (в зависимости от дизайна конкретного эксперимента).

### Оценка антагонистической активности тестовых культур методом перпендикулярных штрихов (cross-streak) [13]

На поверхность АШ в чашке Петри высевали культуру *A. muciniphila* одним сплошным штрихом от одного края чашки до другого с помощью бактериологической петли. Далее инкубировали в анаэробной станции Vactron при +37°C до момента посева тестового микроорганизма, который осуществляли ежедневно в течение 7 дней культивирования монокультуры *A. muciniphila*. Подсев *K. pneumoniae* осуществляли путем нанесения трех штрихов, перпендикулярных изначальному штриху *A. muciniphila*, после чего вновь инкубировали чашки при +37°C, но в двух вариантах: анаэробно в станции Vactron и аэробно в термостате, кроме варианта одномоментного засева двух микроорганизмов. Каждый вариант эксперимента выполняли в двух повторах.

Разные сроки культивирования *A. muciniphila* (до посева культуры *K. pneumoniae*) применяли для оценки влияния возраста культуры и определения необходимой длительности культивирования для проявления антагонистической активности. Анаэробный и аэробный варианты культивирования тестового штамма использовали для уточнения потенциальных механизмов, лежащих в основе возможной антагонистической активности двух микроорганизмов. Поскольку *A. muciniphila* является строгим анаэробом, то после перемещения ее в аэробные условия при посеве тестового штамма активность пробиотической культуры, очевидно, будет практически полностью подавляться кислородом, а антагонистическая активность (при наличии) будет определяться продуктами метаболизма. В случае же анаэробного культивирования можно предположить реакцию живых клеток *A. muciniphila* на присутствие *K. pneumoniae* и, следовательно, возможную реализацию/индукцию других механизмов, обуславливающих бактериостатические свойства.

Для количественной оценки антагонистической активности предполагалось измерение размеров зон ингибирования роста тестового микроорганизма с обеих сторон от штриха пробиотической культуры. В качестве отрицательного контроля использовали физраствор, который наносили на АШ вместо культуры *A. muciniphila*. В качестве положительного контроля использовали раствор антибиотика цефтазидима в концентрации 5 мкг/мл, который также наносили на поверхность агаровой среды вместо *A. muciniphila*.

### Оценка антагонистической активности тестовых культур методом агаровых блоков

На всю поверхность АШ в чашке Петри высевали культуру *A. muciniphila* для получения сплошного газона пробиотической культуры. Далее чашки инкубировали при +37°C в анаэробных условиях в станции Vactron в течение 5 суток. Полученный газон пробиотической культуры использовали для подготовки агаровых блоков. Для этого с помощью стерильных наконечников для пипетки аккуратно, используя широкий конец наконечника, вырезали небольшие кусочки агара с культурой на поверхности. Вторую часть эксперимента проводили на чашках Петри с МПА, куда газоном засекали тестовую культуру *K. pneumoniae*. Сразу после засева на каждую чашку с МПА выкладывали по 6 ранее подготовленных агаровых блоков с культурой *A. muciniphila*, после чего инкубировали в течение 24 ч при +37°C в двух вариантах: анаэробно (в станции Vactron) и аэробно (в термостате). Каждый вариант эксперимента выполняли в двух повторах. В качестве отрицательного контроля использовали агаровые блоки со стерильным АШ (без газона *A. muciniphila*), в качестве положительного контроля – агаровые блоки с АШ с добавлением цефтазидима в концентрации 5 мкг/мл.

### Оценка антагонистической активности тестовых культур методом прямого совместного культивирования

На половину поверхности АШ в чашке Петри осуществляли посев культуры *A. muciniphila* для получения сплошного газона. Чашки инкубировали в течение 5 суток при +37°C в анаэробных условиях. После этого осуществляли посев тестового организма на свободную половину чашки, инкуби-

ровали еще сутки при +37°C в анаэробных условиях. Эксперимент выполнялся в трех повторностях.

**Оценка антагонистической активности тестовых культур методом перевернутого агара [12]**

На всю поверхность АШ в чашке Петри осуществляли посев культуры *A. muciniphila* для получения сплошного газона. Далее чашки инкубировали при +37°C в анаэробных условиях в станции Vacutron в течение 3, 5 или 7 суток. По истечении заданного периода культивирования агар с газоном пробиотической культуры переворачивали и на обратную сторону осуществляли подсев *K. pneumoniae* методом секторного посева по Gold [12]. Далее чашки инкубировали при +37°C в течение суток в двух вариантах: анаэробно (в станции Vacutron) и аэробно (в термостате). Каждый вариант эксперимента выполняли в двух повторах.

Как и в эксперименте с перпендикулярными штрихами, мы применяли разные сроки культивирования пробиотической культуры (3, 5 или 7 суток) для изучения влияния возраста культуры на ее антагонистические свойства, а также разные варианты культивирования (анаэробное и аэробное) для наилучшего понимания механизмов антагонизма.

В качестве отрицательного контроля использовали стерильный АШ без газона пробиотической культуры (для которого выполняли аналогичные манипуляции), а в качестве положительного контроля – АШ с добавлением цефтазидима в концентрации 5 мкг/мл. Оценка антагонистической активности проводилась по количеству выросших колоний *K. pneumoniae* в разных секторах.

**Оценка антагонистической активности тестовых культур методом двухслойного агара [12]**

В данной группе экспериментов мы использовали глубинное культивирование пробиотического микроорганизма в толще АШ, на который наслаивали МПА для последующего подсева тестовой культуры. К 9 мл теплого (но не горячего) расплавленного АШ добавляли 1 мл суспензии *A.*

*muciniphila* в физиологическом растворе, соответствующей 5 единицам по шкале МакФарланда, тщательно перемешивали и заливали в чашку Петри. После застывания АШ на его поверхность наслаивали 10 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА, дожидались застывания. Таким образом получали двухслойный агар, в нижнем слое которого в толщу среды засеяна пробиотическая культура. Далее чашки с двухслойным агаром оставляли на 3 или 5 суток для роста *A. muciniphila*. Культивирование осуществляли как в анаэробных, так и в аэробных условиях (предполагая, что при выращивании *A. muciniphila* в толще среды даже в аэробных условиях можно получить рост). Через предусмотренный промежуток времени (3 или 5 суток) на верхний слой среды МПА засеивали свежую культуру *K. pneumoniae* по методу Gold для возможности количественной оценки. Далее чашки инкубировали при +37°C в течение суток в двух вариантах: анаэробно (в станции Vacutron) и аэробно (в термостате). Каждый вариант эксперимента выполняли в двух повторах. Варианты культивирования представлены в таблице.

В качестве отрицательного контроля использовали стерильный АШ без добавления в толщу среды пробиотической культуры, в качестве положительного контроля – АШ с добавленным цефтазидимом в концентрации 5 мкг/мл. Оценка антагонистической активности проводилась по количеству выросших колоний *K. pneumoniae* в разных секторах.

**Результаты исследования и их обсуждение**

**Оценка антагонистической активности тестовых культур методом перпендикулярных штрихов (cross-streak)**

При учете результатов нам не удалось детектировать антагонизм *A. muciniphila* в отношении *K. pneumoniae* ни на одной из чашек. Ни сроки культивирования, ни разные его варианты после подсева тестовой культуры (анаэробное или аэробное культивирование) не влияли на результат. На всех чашках фиксировался хороший рост *K. pneumoniae* в непо-

Таблица. Варианты культивирования при оценке антагонистической активности *A. muciniphila* в отношении *K. pneumoniae* методом двухслойного агара

Table. Variants of cultivation in the two-layer agar test for assessing antagonistic activity of *A. muciniphila* against *K. pneumoniae*

Вариант / Variant	Первый этап / First stage	Второй этап (подсев) / Second stage (inoculation of the test microorganism)
	Культивирование <i>A. muciniphila</i> / Cultivation of <i>A. muciniphila</i>	Культивирование <i>K. pneumoniae</i> / Cultivation of <i>K. pneumoniae</i>
1	В толще АШ, анаэробно / In Schaedler agar; anaerobic	На поверхности МПА, анаэробно / On the surface of meat peptone agar; anaerobic
2	В толще АШ, анаэробно / In Schaedler agar; anaerobic	На поверхности МПА, аэробно / On the surface of meat peptone agar; aerobic
3	В толще АШ, аэробно / In Schaedler agar; aerobic	На поверхности МПА, аэробно / On the surface of meat peptone agar; aerobic

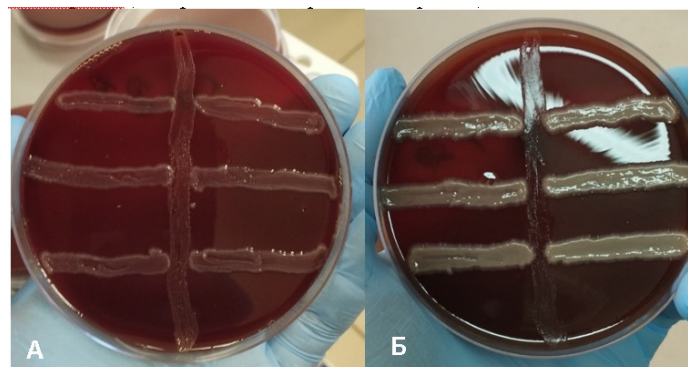


Рис. 1. Агар Шедлера с суточной культурой *K. pneumoniae* (три горизонтальных штриха), которая подсеивалась к пятидневной культуре *A. muciniphila* (вертикальный штрих). Аэробное (А) и анаэробное (Б) культивирование после подсева *K. pneumoniae*. Ограничения роста *K. pneumoniae* не наблюдается.

Fig. 1. Schaedler agar with a 24-hour culture of *K. pneumoniae* (three horizontal streaks), which was inoculated onto a 5-day culture of *A. muciniphila* (vertical streak). Aerobic (A) and anaerobic (B) cultivation after inoculation of *K. pneumoniae*. No growth restriction of *K. pneumoniae* was observed.

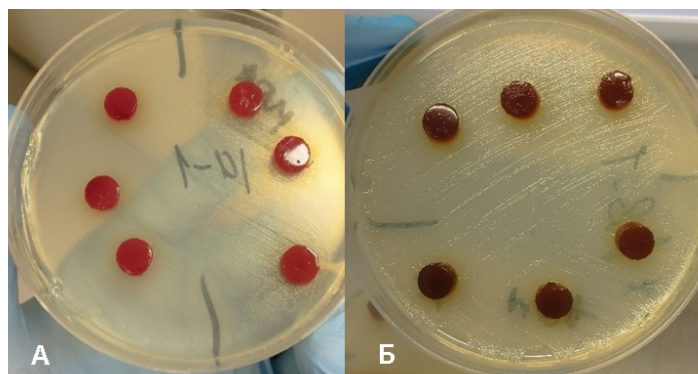


Рис. 2. Мясопептонный агар с суточной культурой *K. pneumoniae* и агаровыми блоками с пятидневным газоном *A. muciniphila*. Аэробное (А) и аэробное (Б) культивирование. Фиксируется сплошной рост *K. pneumoniae*, зон ограничения роста вокруг агаровых блоков нет.

Fig. 2. Meat-peptone agar with a 24-hour culture of *K. pneumoniae* and agar blocks with a five-day lawn of *A. muciniphila*. Aerobic (A) and aerobic (B) cultivation. Continuous growth of *K. pneumoniae* is observed; there are no growth restriction zones around the agar blocks.

средственной близости от штриха *A. muciniphila*. Зон лизиса ни в одной из повторностей выявлено не было. В качестве примера на рис. 1 представлены результаты метода перпендикулярных штрихов, где подсев *K. pneumoniae* осуществляли к пятидневной культуре *A. muciniphila* (анаэробный и аэробный варианты).

Кроме того, мы не наблюдали зон лизиса и в положительном контроле, где вместо штриха на среду наносили раствор цефтазидима. Вероятнее всего, это связано с ограниченностью зоны нанесения антибиотика (в виде одной узкой полосы) и особенностями его диффузии в плотной питательной среде, что не дало возможности достигнуть концентрации, способной ограничить рост *K. pneumoniae*.

#### **Оценка антагонистической активности тестовых культур методом агаровых блоков**

Метод агаровых блоков также не продемонстрировал наличия какой-либо антагонистической активности *A. muciniphila* в отношении *K. pneumoniae*. Ни на одной из чашек не наблюдалось зон ограничения роста вокруг наложенных на МПА агаровых блоков с газоном *A. muciniphila* (рис. 2).

Важно отметить, что использование агаровых блоков с цефтазидимом в качестве положительного контроля также не дало никаких видимых зон лизиса. Вероятнее всего, это связано с весьма ограниченной диффузией как антибиотика в контроле, так и бактериостатических веществ, потенциально синтезируемых *A. muciniphila* в среду, на которой выращивали тестовый микроорганизм. Небольшая площадь агаровых блоков и недостаточно тесный контакт двух питательных сред (МПА и АШ) в зоне их взаимодействия, по-видимому, определили полученные нами результаты.

#### **Оценка антагонистической активности тестовых культур методом прямого совместного культивирования**

При оценке антагонистической активности *A. muciniphila* в отношении *K. pneumoniae* данным методом мы обнаружили

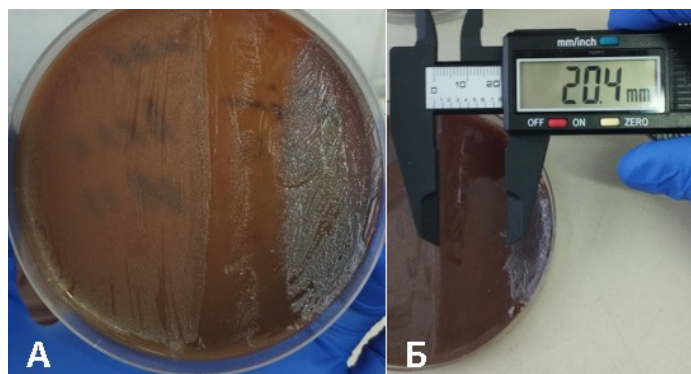


Рис. 3. Агар Шедлера с суточной культурой *K. pneumoniae* (справа), которая засеивалась на среду с пятидневным газоном *A. muciniphila* (слева). Анаэробное культивирование. Фиксируется значительное угнетение роста *K. pneumoniae*. Общий вид чашки с двумя культурами (А) и измерение зоны лизиса (Б).

Fig. 3. Schaedler agar with a 24-hour *K. pneumoniae* culture (right) inoculated onto a medium containing a 5-day-old *A. muciniphila* lawn (left). Anaerobic cultivation. Significant inhibition of *K. pneumoniae* growth is observed. General view of the plate with two cultures (A) and measurement of the lysis zone (B).

достаточно серьезное угнетение роста тестового штамма пробиотической культурой (рис. 3). Зона лизиса в среднем составляла от 14 до 20 мм.

Данная методика была первой, с помощью которой нам удалось зафиксировать наличие антагонизма между изучаемыми штаммами, поэтому для дальнейшего изучения антагонизма исследуемых культур мы предпочли методики с засевом больших площадей питательных сред пробиотическими штаммами. Вероятнее всего, *A. muciniphila* способна демонстрировать свои бактериостатические свойства *in vitro* только при достижении определенной плотности колоний на поверхности среды и/или выделения достаточного количества метаболитов в среду для культивирования. В методиках перпендикулярных штрихов и агаровых блоков такие условия для этого микроорганизма не создаются. *A. muciniphila*, по всей видимости, не обладает сверхвысокими антагонизмом в отношении *K. pneumoniae*, который может демонстрироваться некоторыми другими, более «сильными» видами бактерий и грибов, продуцирующими высокоактивные бактериоцины или другие угнетающие рост метаболиты. Для таких микроорганизмов методы штрихов и агаровых блоков будут вполне подходящими. А для более «слабых» в антагонистическом плане пробиотических штаммов целесообразно сделать выбор в пользу других методов. В целом наши предположения подтвердились в последующих экспериментах, которые описаны ниже.

#### **Оценка антагонистической активности тестовых культур методом перевернутого агара**

Данный метод позволил нам зафиксировать полное угнетение роста на средах с газоном *A. muciniphila*. При этом возраст пробиотической культуры не оказывал влияния на антагонистические свойства (либо его влияние невозможно зафиксировать в рамках текущего эксперимента), поскольку уже трехдневная *A. muciniphila* полностью подавляла рост *K. pneumoniae*. Не оказывало влияние и отсутствие/наличие кислорода после подсева тестового микроорганизма: во

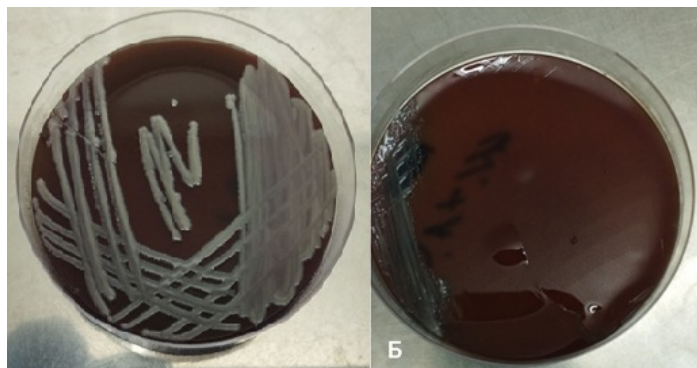


Рис. 4. А – отрицательный контроль. Перевернутый агар Шедлера через сутки после засева *K. pneumoniae*, аэробное культивирование. Рост *K. pneumoniae* во всех секторах. Б – положительный контроль. Перевернутый агар Шедлера с цефтазидимом через сутки после засева *K. pneumoniae*, аэробное культивирование. Рост *K. pneumoniae* в одном секторе ( $\approx 10^5$  КОЕ).

Fig. 4. A – negative control. Inverted Schaedler agar 24 hours after inoculation with *K. pneumoniae*, aerobic cultivation. *K. pneumoniae* growth in all sectors. B – positive control. Inverted Schaedler agar with ceftazidime 24 hours after inoculation with *K. pneumoniae*, aerobic cultivation. *K. pneumoniae* growth in one sector ( $\approx 10^5$  CFU).

всех случаях роста *K. pneumoniae* на обратной стороне АШ не было.

При этом наблюдался стабильный рост *K. pneumoniae* во всех секторах на перевернутом АШ без пробиотической культуры (отрицательный контроль) и значительно угнетенный ее рост на АШ с антибиотиком (положительный контроль) (рис. 4).

Для того чтобы исключить вероятность ложноположительных результатов из-за того, что пробиотическая культура, будучи первой засеяна на среду, просто обеднила ее,



Рис. 5. Агар Шедлера с пятидневным газоном *A. muciniphila* (на дне чашки после переворачивания агара) через 4 суток после засева *R. faecis* на обратную сторону агара, анаэробное культивирование. Наблюдается угнетенный рост *R. faecis* во всех секторах чашки Петри ( $\approx 10^9$  КОЕ).

Fig. 5. Schaedler agar with a five-day lawn of *A. muciniphila* (on the bottom of the dish after turning the agar over) four days after inoculating *R. faecis* on the back of the agar, anaerobic cultivation. Inhibited growth of *R. faecis* is observed in all sectors of the Petri dish ( $\approx 10^9$  CFU).

сделав невозможным рост других микроорганизмов, мы провели дополнительный эксперимент, где использовали в качестве тестового штамма не *K. pneumoniae*, а другой пробиотический штамм, *R. faecis*, который подсевали на перевернутый агар с пятидневной культурой *A. muciniphila*. В результате мы зафиксировали несколько угнетенный, но тем не менее хорошо заметный рост *R. faecis* на обратной стороне агара (рис. 5). Данный микроорганизм, как и *A. muciniphila*, является строгим анаэробом и достаточно требователен к составу питательной среды, на простых средах роста не дает. Несмотря на это, на среде после пятидневного культивирования *A. muciniphila* наблюдался рост *R. faecis*, следовательно, питательных веществ было достаточно даже для такого «капризного» микроорганизма. Таким образом, бактериостатическая активность, наблюдаемая в отношении как *K. pneumoniae*, так и *R. faecis*, не является результатом обеднения среды в нашем эксперименте с поэтапным культивированием. Кроме того, последующая серия экспериментов с использованием двухслойных питательных сред (см. раздел «Оценка антагонистической активности тестовых культур методом двухслойного агара»), где тестовый микроорганизм выращивали на МПА, наслоенном на АШ, подтверждает наше предположение.

Интересно отметить, что антагонистические свойства *A. muciniphila* проявлялись как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Следовательно, можно предположить, что основную роль в ограничении роста двух тестовых микроорганизмов все же играли некие продукты метаболизма, в большом количестве выделяемые пробиотической культурой в окружающую среду, а не сама культура. Очевидно, что после анаэробного культивирования *A. muciniphila* при перемещении ее в кислородные условия быстро утрачивает свою жизнеспособность, но питательная среда за счет диффузии метаболитов сохраняет возможность полностью или частично ограничивать рост других бактерий.

Безусловно, отдельного внимания заслуживает вопрос, в отношении каких именно культур проявляет свою антагонистическую активность *A. muciniphila*. В текущем исследовании мы протестировали лишь два вида микроорганизмов и наблюдали разную степень выраженности антагонистической активности: от частичного подавления роста *R. faecis* до полного угнетения *K. pneumoniae* при всех вариантах культивирования. Можно сделать спекулятивное предположение, что другие пробиотические штаммы, которые, согласно результатам метагеномных исследований микробиома желудочно-кишечного тракта, зачастую демонстрируют положительную корреляцию с *A. muciniphila*, менее чувствительны к ее продуктам и способны успешно сосуществовать с ней, в то время как многие патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, в т.ч. *K. pneumoniae*, в основном отрицательно коррелируют со различными видами пробиотических микроорганизмов [14, 15]. Однако для подтверждения такой гипотезы требуются дополнительные исследования с экспериментальной проверкой антагонистических свойств *A. muciniphila* в отношении культур как пробиотических, так и условно-патогенных и патогенных бактерий. Также крайне актуально более подробное изучение механизмов, лежащих в основе наблюдаемого антагонизма, с подробным анализом метаболитов *A. muciniphila*.

### Оценка антагонистической активности тестовых культур методом двухслойного агара

В данной серии экспериментов при полностью анаэробном культивировании обоих микроорганизмов (как *A. muciniphila* в толще среды, так и *K. pneumoniae* на МПА; вариант 1) мы получили результаты, аналогичные таковым при использовании метода перевернутого агара. Как трехдневная, так и пятидневная глубинная культура *A. muciniphila* полностью подавляла рост *K. pneumoniae* на поверхности МПА при инкубировании чашек в анаэробных условиях. Помимо прочего, это указывает именно на специфическое ингибирование роста, но не на обеднение питательной среды, поскольку в данном случае тестовый микроорганизм выращивался на второй среде.

Результаты контрольных экспериментов (отрицательный и положительный контроль) также соответствовали ожидаемым: хороший рост *K. pneumoniae* в случае отсутствия пробиотической культуры в АШ и сильно угнетенный рост при добавлении антибиотика в АШ (рис. 6).

Однако замена хотя бы на одном этапе анаэробного культивирования аэробным (варианты 2 и 3) полностью меняла результаты эксперимента. Как при аэробном культивировании только после подсева *K. pneumoniae* (вариант 2), так и при аэробном культивировании с самого начала (вариант 3) наблюдалось значительное снижение ингибирования роста тестируемой культуры. При использовании вариантов 2 и 3 наблюдали лишь частичное угнетение роста тестовой культуры, которое при секторном посеве либо проявлялось в виде роста не во всех секторах, либо характеризовалось более редким расположением колоний на питательной среде (рис. 7). При этом возраст пробиотической культуры, выращенной в толще АШ, не оказывал влияния на результаты.

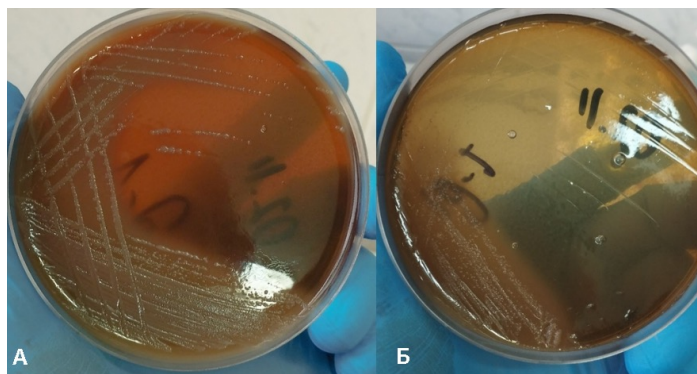


Рис. 6. А – отрицательный контроль. Двухслойный агар: нижний слой – агар Шедлера без пробиотической культуры; верхний слой – мясопептонный агар через сутки после засева *K. pneumoniae* по Gold, анаэробное культивирование. Хороший рост *K. pneumoniae*. Б – положительный контроль. Двухслойный агар: нижний слой – агар Шедлера с антибиотиком; верхний слой – мясопептонный агар через сутки после засева *K. pneumoniae* по Gold, анаэробное культивирование. Наблюдается значительное угнетение роста *K. pneumoniae* ( $\approx 10^4$  КОЕ).

Fig. 6. A – negative control. Two-layer agar: the lower layer is Schaedler agar without probiotic culture; the upper layer is meat-peptone agar 24 hours after inoculation with *K. pneumoniae* according to Gold, anaerobic cultivation. Good growth of *K. pneumoniae*. B – positive control. Two-layer agar: the lower layer is Schaedler agar with antibiotic; the upper layer is meat-peptone agar 24 hours after inoculation with *K. pneumoniae* according to Gold, anaerobic cultivation. Significant inhibition of *K. pneumoniae* growth is observed ( $\approx 10^4$  CFU).

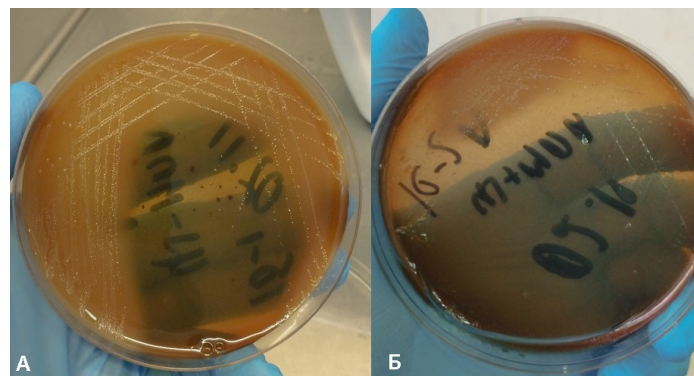


Рис. 7. А – двухслойный агар: нижний слой – агар Шедлера с трехдневной культурой *A. muciniphila* (в толще среды, анаэробное культивирование); верхний слой – мясопептонный агар через сутки после засева *K. pneumoniae* по методу Gold, аэробное культивирование (вариант 2). Рост *K. pneumoniae* хороший, но не сливной, наблюдается несколько «разреженное» расположение колоний. Б – двухслойный агар: нижний слой – агар Шедлера с пятидневной *A. muciniphila* (в толще среды, аэробное культивирование); верхний слой – мясопептонный агар через сутки после засева *K. pneumoniae* по методу Gold, аэробное культивирование (вариант 3). Рост *K. pneumoniae* умеренный, не во всех секторах ( $\approx 10^5$  КОЕ).

Fig. 7. A – two-layer agar: the lower layer is Schaedler agar with a three-day culture of *A. muciniphila* (in the thickness of the medium, anaerobic cultivation); the upper layer is meat-peptone agar 24 hours after inoculation with *K. pneumoniae* using the Gold method, aerobic cultivation (option 2). The growth of *K. pneumoniae* is good, but not confluent; a somewhat “sparse” arrangement of colonies is observed. B – two-layer agar: the lower layer is Schaedler agar with five-day *A. muciniphila* (in the thickness of the medium, aerobic cultivation); the upper layer is meat-peptone agar 24 hours after inoculation with *K. pneumoniae* using the Gold method, aerobic cultivation (option 3). The growth of *K. pneumoniae* is moderate, not in all sectors ( $\approx 10^5$  CFU).

Такое влияние смены способа культивирования (полная или частичная замена анаэробных условий на аэробные) представляется весьма интересным. Во-первых, несмотря на то, что *A. muciniphila* культивируется преимущественно поверхностным способом, вполне возможно рассматривать ее выращивание в толще среды. В полностью анаэробных условиях такой способ, по всей вероятности, не сильно отличается от поверхностного и обеспечивает те же самые результаты. В то же время очевидно, что аэробное культивирование даже в толще среды не обеспечивает достаточной защиты от кислорода строгим анаэробам, снижает потенциал их роста, а следовательно, и антагонистическую активность. Однако это вполне может быть и не основным фактором, лимитирующим бактериостатическую активность, на что указывают результаты второго варианта культивирования в рамках этого метода (анаэробное для *A. muciniphila* с последующим аэробным для *K. pneumoniae*). В данном случае в первую очередь следует отметить особенности роста тестового штамма в присутствии/отсутствии кислорода. Являясь факультативным анаэробом, *K. pneumoniae* все же предпочитает аэробные условия, демонстрируя наилучшие показатели роста именно в кислородной среде. Возможно, несколько сниженный за счет глубинного культивирования антагонистический потенциал *A. muciniphila* оказывается достаточным для подавления роста *K. pneumoniae* в менее комфортных для нее анаэробных условиях, но при смене условий на аэробные его становится недостаточно для пода-

вления роста тестовой культуры. Кроме того, можно предположить, что наличие или отсутствие кислорода может каким-то образом влиять на диффузию продуктов метаболизма микроорганизмов на стыке двух питательных сред.

Несмотря на сложность интерпретации результатов данной методики, находки ее определенно представляют большой интерес. С имеющимися на сегодняшний день результатами проблематично ответить на вопрос, почему смена условий культивирования на аэробные так резко повлияла на результаты. Дальнейшие исследования с использованием методики двухслойного агара с разными комбинациями сред, микроорганизмов и условий культивирования смогут помочь лучше понять происходящие процессы.

На наш взгляд, описываемый усложненный способ оценки антагонизма с двумя средами более актуален для определения антагонистической активности между теми микроорганизмами, которые не могут расти на одной среде. В подобном случае у исследователя нет возможности применить метод перевернутого агара либо совместного культивирования на одной среде, которые более просты и, вероятно, надежны, дают более стабильные результаты, учитывая отсутствие возможных дополнительных трудностей, связанных с глубинным культивированием, диффузией метаболитов на стыке сред и т.д. При изучении антагонистической активности пробиотических культур, особенно пробиотиков нового поколения, высокая требовательность этих микроорганизмов к составу питательной среды определяет необходимость применения сложных, многокомпонентных сред. Но эта же их особенность обеспечивает значительный плюс – возможность культивирования тестовых штаммов на той же самой среде, без необходимости совмещения разных типов сред. Использование одной среды упрощает эксперимент, повышая надежность, сокращает время, позволяет осуществлять как одновременное, так и поэтапное культивирование (в зависимости от особенностей скорости роста микроорганизмов-антагонистов), а также обеспечивает наращивание значительного количества бактериальной биомассы (что может быть критично в случае умеренного бактериостатического потенциала).

### Заключение

В нашем исследовании мы апробировали несколько методик детекции антагонистической активности двух микроорганизмов на примере пары *A. muciniphila* – *K. pneumoniae* для выбора той, которая бы оптимально подошла для работы с пробиотическими культурами, учитывая такие их особенности, как требовательность к составу питательных сред, чувствительность к кислороду, вероятно, умеренную выраженность антагонистических свойств по сравнению с другими, более «агрессивными» микроорганизмами – продуцентами различных антимикробных веществ. Мы с уверенностью можем сказать, что методики, обеспечивающие лишь ограниченный контакт между двумя тестируемыми штаммами (метод перпендикулярных штрихов, методов агаровых блоков), вряд ли подойдут для выявления умеренного антагонизма. Несмотря на относительную простоту, быстроту и удобство этих двух методик, что является их неоспоримым преимуществом, их чувствительность может быть недостаточ-

ной для определенных микроорганизмов. Действительно, для того чтобы зафиксировать антагонистическую активность этими методами, тестируемый штамм, вероятно, должен обладать крайне высоким потенциалом ограничения роста других культур. В противном случае можно получить ложноотрицательный результат, как было в нашем исследовании. Безусловно, делать однозначные выводы о применимости метода перпендикулярных штрихов и метода агаровых блоков на основании экспериментов лишь с одним пробиотическим штаммом было бы поспешным, но, предварительные выводы, на наш взгляд, вполне допустимы.

Анализ результатов привел нас к заключению, что оптимальными методиками для оценки антагонистического потенциала исследованного штамма *A. muciniphila* (и, возможно, других пробиотических микроорганизмов) являются одновременное культивирование на одной питательной среде и метод перевернутого агара. Эти техники позволили, во-первых, зафиксировать наличие антагонистической активности для нашей пары бактерий, а во-вторых, продемонстрировали хорошую повторяемость результатов. В целом эти методики удобны, быстры в исполнении, позволяют проводить количественную оценку, не требуют сложных манипуляций и большого расхода сред (как, например, в методе серийных разведений). Метод перевернутого агара может быть чуть более сложным и требующим большой аккуратности исполнения, однако его чувствительность, по всей видимости, гораздо выше, чем у всех остальных. Это позволяет применять его для изучения тех микроорганизмов, которые не способны демонстрировать ярко выраженные антагонистические свойства. Следует также помнить, что как метод совместного культивирования, так и метод перевернутого агара подходят лишь для тех пар микроорганизмов, которые могут выращиваться на одной питательной среде, что объективно является минусом данной техники оценки антагонизма.

В случае необходимости работы с микроорганизмами, которые требуют разных по составу питательных сред, и при этом изучаемый штамм предположительно не обладает сильным антагонизмом в отношении тестовой культуры, пожалуй, одним из немногих доступных методов остается метод двухслойного агара. С технической точки зрения эта методика является наиболее сложной и трудозатратной из всех вышеописанных. Кроме того, многие нюансы ее выполнения (необходимость глубинного культивирования, наслаивания питательных сред определенной толщины, при строгом соблюдении температуры и т.д.) будут требовать большого опыта от бактериолога, а любые неточности могут в конечном итоге влиять на результаты экспериментов. Тем не менее ее использование, на наш взгляд, оправдано именно для микроорганизмов с относительно невысоким антагонистическим потенциалом в том случае, когда тестовая культура требует другой питательной среды. Метод агаровых блоков в данном случае, хотя и будет формально подходить, может не позволить выявить существующий слабый антагонизм между штаммами.

Безусловно, результаты проведенного эксперимента не позволяют нам сделать однозначный вывод о механизмах, лежащих в основе наблюдаемого нами антагонизма между *A. muciniphila* и *K. pneumoniae*. Есть некоторые основания

полагать, что *A. muciniphila* действует не путем активной конкуренции за питательный субстрат и подавления *K. pneumoniae*, а выделяет в окружающую среду некие метаболиты, которые в значительной мере препятствуют росту тестового штамма. На данном этапе исследований не представляется возможным установить химическую природу данных метаболитов, а также дать оценку их терапевтического потенциала. Кроме того, следует отметить, что фиксируемые *in vitro* взаимоотношения двух культур могут отличаться от таковых *in vivo*, где данные микроорганизмы являются частью чрезвычайно сложно организованных и изменчивых бактериальных сообществ, что может в корне менять механизм и характер их взаимодействия. Тем не менее исследования антагонистической активности не теряют своей актуальности, поскольку предоставляют вполне реальную и относительно легко реализуемую возможность изучить особенности конкретных штаммов, что в последующем поможет хотя бы частично пролить свет на такие важные и перспективные для исследователя аспекты, как механизмы пробиотической активности, а также лучше понять терапевтический потенциал изучаемых микроорганизмов.

При выборе метода для оценки антагонистической активности следует ориентироваться прежде всего на особенности пар микроорганизмов, в т.ч. возможность их совместного культивирования на одной питательной среде, а также предположений о возможной силе антагонизма. Если есть вероятность того, что тестируемый штамм обладает лишь умеренной способностью подавлять рост других микроорганизмов, то лучше сделать выбор в пользу методов перевернутого агара или двухслойного агара, поскольку они могут обеспечить более высокую чувствительность.

#### Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

#### Financial support

No financial support has been provided for this work.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Вклад авторов

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

#### Author contributions

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

#### Литература

1. Ogunrinola GA, Oyewale JO, Oshamika OO, Olasehinde GI. The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *Int J Microbiol.* 2020 Jun 12;2020:8045646. DOI: 10.1155/2020/8045646

2. Aggarwal N, Kitano S, Pua H, Kittelmann S, Hwang IY, Chang MW. Microbiome and Human Health: Current Understanding, Engineering, and Enabling Technologies. *Chem Rev.* 2023 Jan 11;123(1):31-72. DOI: 10.1021/acs.chemrev.2c00431
3. Shahab M, Shahab N. Coevolution of the Human Host and Gut Microbiome: Metagenomics of Microbiota. *Cureus.* 2022 Jun 24;14(6):e26310. DOI: 10.7759/cureus.26310
4. Oliphant K, Allen-Vercoe E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome.* 2019 Jun 13;7(1):91. DOI: 10.1186/s40168-019-0704-8
5. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Apr 23;7(1):135. DOI: 10.1038/s41392-022-00974-4
6. Man WH, de Steenhuisen P, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* 2017 May;15(5):259-270. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.14
7. Khaledi M, Poursalamfar B, Alsaab HO, Tafaghodi Sh, Hjaz A, Singh R, et al. The role of gut microbiota in human metabolism and inflammatory diseases: a focus on elderly individuals. *Ann Microbiol.* 2024;74(1). DOI: 10.1186/s13213-023-01744-5
8. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014 Mar 27;157(1):121-41. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011
9. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev.* 2017 Sep;279(1):70-89. DOI: 10.1111/imr.12567
10. Vijay A, Valdes AM. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. *Eur J Clin Nutr.* 2022 Apr;76(4):489-501. DOI: 10.1038/s41430-021-00991-6
11. Fijan S. Probiotics and Their Antimicrobial Effect. *Microorganisms.* 2023 Feb 19;11(2):528. DOI: 10.3390/microorganisms11020528
12. Патент №2412989 С1 Российская Федерация, МПК С12Н 1/00, А61К 35/74. Способ индивидуального выявления антагонистической активности пробиотических препаратов, содержащих лактобактерии и/или бифидобактерии, в отношении условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при диагностике дисбактериоза кишечника: №2009145605/10: заявл. 08.12.2009: опубл. 27.02.2011. Оришак ЕА, Бойцов АГ, Нилова ЛЮ; заявитель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И.Мечникова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию".
13. Lo Giudice A, Brilli M, Bruni V, De Domenico M, Fani R, Michaud L. Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). *FEMS Microbiol Ecol.* 2007 Jun;60(3):383-96. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00300.x
14. Li X, Li Z, He Y, Li P, Zhou H, Zeng N. Regional distribution of *Christensenellaceae* and its associations with metabolic syndrome based on a population-level analysis. *PeerJ.* 2020 Aug 4;8:e9591. DOI: 10.7717/peerj.9591
15. Xu C, Jiang H, Feng LJ, Jiang MZ, Wang YL, Liu SJ. *Christensenella minuta* interacts with multiple gut bacteria. *Front Microbiol.* 2024 Feb 19;15:1301073. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1301073

#### References

1. Ogunrinola GA, Oyewale JO, Oshamika OO, Olasehinde GI. The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *Int J Microbiol.* 2020 Jun 12;2020:8045646. DOI: 10.1155/2020/8045646
2. Aggarwal N, Kitano S, Pua H, Kittelmann S, Hwang IY, Chang MW. Microbiome and Human Health: Current Understanding, Engineering, and Enabling Technologies. *Chem Rev.* 2023 Jan 11;123(1):31-72. DOI: 10.1021/acs.chemrev.2c00431

3. Shahab M, Shahab N. Coevolution of the Human Host and Gut Microbiome: Metagenomics of Microbiota. *Cureus*. 2022 Jun 24;14(6):e26310. DOI: 10.7759/cureus.26310
4. Oliphant K, Allen-Vercoe E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*. 2019 Jun 13;7(1):91. DOI: 10.1186/s40168-019-0704-8
5. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Apr 23;7(1):135. DOI: 10.1038/s41392-022-00974-4
6. Man WH, de Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol*. 2017 May;15(5):259-270. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.14
7. Khaledi M, Poureslamfar B, Alsaab HO, Tafaghodi Sh, HJazi A, Singh R, et al. The role of gut microbiota in human metabolism and inflammatory diseases: a focus on elderly individuals. *Ann Microbiol* 2024;74(1). DOI: 10.1186/s13213-023-01744-5
8. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):121-41. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011
9. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017 Sep;279(1):70-89. DOI: 10.1111/imr.12567
10. Vijay A, Valdes AM. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. *Eur J Clin Nutr*. 2022 Apr;76(4):489-501. DOI: 10.1038/s41430-021-00991-6
11. Fijan S. Probiotics and Their Antimicrobial Effect. *Microorganisms*. 2023 Feb 19;11(2):528. DOI: 10.3390/microorganisms11020528
12. Patent No. 2412989 C1 Russian Federation, IPC C12N 1/00, A61K 35/74. Method for individual detection of antagonistic activity of probiotic preparations containing lactobacilli and/or bifidobacteria against opportunistic microorganisms isolated during diagnosis of intestinal dysbacteriosis: No. 2009145605/10: declared 08.12.2009: published 27.02.2011. Orishak EA, Boytsov AG, Nilova LYu; applicant State Educational Institution of Higher Professional Education "I.I.Mechnikov St. Petersburg State Medical Academy of the Federal Agency for Healthcare and Social Development". (In Russian).
13. Lo Giudice A, Brilli M, Bruni V, De Domenico M, Fani R, Michaud L. Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). *FEMS Microbiol Ecol*. 2007 Jun;60(3):383-96. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00300.x
14. Li X, Li Z, He Y, Li P, Zhou H, Zeng N. Regional distribution of *Christensenellaceae* and its associations with metabolic syndrome based on a population-level analysis. *PeerJ*. 2020 Aug 4;8:e9591. DOI: 10.7717/peerj.9591
15. Xu C, Jiang H, Feng LJ, Jiang MZ, Wang YL, Liu SJ. *Christensenella minuta* interacts with multiple gut bacteria. *Front Microbiol*. 2024 Feb 19;15:1301073. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1301073

#### Информация о соавторах:

Волков Михаил Александрович, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0009-0005-8124-7869

Панькова Марина Николаевна, биолог лаборатории микробиологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России

Федец Злата Евгеньевна, биолог лаборатории микробиологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России

Загайнова Анжелика Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0000-0003-4772-9686

Побережный Даниил Юрьевич, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0000-0001-7281-4714

Даниэль Вероника Вячеславовна, кандидат медицинских наук, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0000-0003-0547-3280

Макаров Валентин Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий отделом анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0000-0001-9495-0266

Муравьева Вера Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России  
ORCID: 0000-0003-0383-0731

Гордеев Алексей Борисович, кандидат биологических наук, заведующий отделом молекулярной микробиологии и биоинформатики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России  
ORCID: 0000-0002-9171-5276

Припутневич Татьяна Валерьевна, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, главный внештатный специалист по медицинской микробиологии Минздрава России, директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России  
ORCID: 0000-0002-4126-9730

Юдин Владимир Сергеевич, кандидат медицинских наук, директор Института синтетической биологии и медицины ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0000-0002-9199-625

Кескинов Антон Артурович, кандидат медицинских наук, кандидат экономических наук, начальник Управления организации проведения научных исследований ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0000-0001-7378-983X

Каштанова Дарья Андреевна, кандидат медицинских наук, заместитель начальника Отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0000-0001-8977-4384

Юдин Сергей Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, генеральный директор ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России  
ORCID: 0000-0002-7942-8004

#### Information about co-authors:

Mikhail A. Volkov, analyst in the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0009-0005-8124-7869

Marina N. Pankova, biologist at the Laboratory of Microbiology and Parasitology, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency

Zlata E. Fedets, biologist at the Laboratory of Microbiology and Parasitology, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency

Anzhelika V. Zagaynova, PhD in Biological Sciences, head of the Laboratory of Microbiology and Parasitology, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0000-0003-4772-9686

Daniil Yu. Poberezhnyi, analyst in the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0000-0001-7281-4714

Veronika V. Daniel, PhD, MD, analyst in the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0000-0003-0547-3280

Valentin V. Makarov, PhD in Biological Sciences, Head of the Department for Analysis and Prognosing of Medical and Biological Health Risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0000-0001-9495-0266

Vera V. Muravieva, PhD in Biological Sciences, senior research fellow in the Laboratory of Molecular Microbiology, Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation  
ORCID: 0000-0003-0383-0731

Alexey B. Gordeev, PhD in Biological Sciences, Head of the Department of Molecular Microbiology and Bioinformatics, Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation  
ORCID: 0000-0002-9171-5276

Tatiana V. Pripitnevich, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, chief consultant for medical microbiology at the Ministry of Health of the Russian Federation, Director of the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy, and Epidemiology, Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation  
ORCID: 0000-0002-4126-9730

Vladimir S. Yudin, PhD, MD, Director of the Institute of Synthetic Biology and Medicine, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0000-0002-9199-6258

Anton A. Keskinov, PhD, MD, PhD in Economic Sciences, Head of the Department for the Organization of Research, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0000-0001-7378-983X

Daria A. Kashtanova, PhD, MD, Deputy Head of the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0000-0001-8977-4384

Sergey M. Yudin, MD, PhD, DSc, Professor, Director of Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Biomedical Agency  
ORCID: 0000-0002-7942-8004

## НОВОСТИ НАУКИ

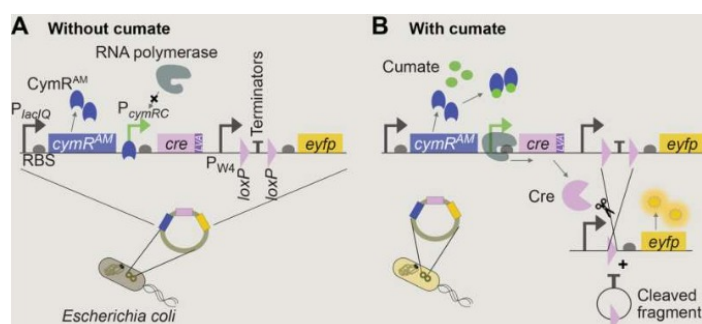
### Инженерные *E. coli* могут отслеживать мышьяк, предлагая дешевый биосенсор

Способность индуцировать наследственные геномные изменения в ответ на экологические сигналы ценна для экологического биосенсирования, экспериментального изучения микробной экологии и эволюции, а также для приложений в области синтетической биологии.

Ситеспецифические рекомбиназы обеспечивают путь к генетической памяти путем целевых модификаций ДНК, но их высокая специфичность и эффективность компенсируются утечкой экспрессии и ограниченной настраиваемостью у прокариот. Мы разработали строго регулируемую, титруемую систему Cre-рекомбиназы для *Escherichia coli*, которая достигает низких скоростей рекомбинации и минимальной базовой активности. Реализованная как на плазидах, так и на хромосоме, последняя показала превосходное сохранение генетической памяти через поколения. Эти функции делают систему широко применимой для экологического биосенсирования и других приложений.

Чтобы продемонстрировать применимость к экологическому биосенсированию, мы разработали цельноклеточный биосенсор на основе рекомбинации для арсенита, токсичного и повсеместного загрязнителя, который в основном мобилизуется в бескислородных средах, таких как затопляемые почвы, осадки и водоносные горизонты. Однако существующие цельноклеточные биосенсоры арсенита сталкиваются с ограничениями по чувствительности и технологии в анаэробных условиях. Наш биосенсор надежно записывал бескислородное воздействие арсенита как стабильную генетическую память для задержанного флуоресцентного отсчета в аэробных условиях, с чувствительностью обнаружения, сопоставимой с традиционными методами мокрого химического анализа. Разделяя воздействие и измерение, этот подход создает основу для биосенсирования арсенита в полевых условиях, включая вариабельность окислительно-восстановительного потенциала и другие физико-химические градиенты, без ограничений анаэробных измерений.

В более широком смысле, способность индуцировать низкоскоростные, наследуемые генетические изменения расширяет генетический инструментарий для экологически реагирующих систем с приложениями в области экологического мониторинга, биопроизводства и биотехнологии, а также экспериментальных исследований микробной экологии, эволюции и взаимодействия хозяин-микроорганизм.



Garabello E, Yoon H, Reid MC, Giometto A.

Tunable low-rate genomic recombination with Cre-lox in *Escherichia coli*: a versatile tool for anoxic environmental biosensing and synthetic biology. *Appl Environ Microbiol.* 2026; e01768-25. DOI: 10.1128/aem.01768-25