

Анализ бактериального состава кисломолочной продукции с помощью высокопроизводительного секвенирования

Михаил Ю. Сыромятников^{1,2} mihan.vrn@mail.ru  0000-0001-9018-0613

1 Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия

2 Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, Россия

Аннотация. Контаминация микроорганизмами продуктов питания приводит к изменению их текстуры, вкуса и аромата, существенно сокращает срок хранения. Развитие высокопроизводительных методов анализа ДНК позволило усовершенствовать скрининг микроорганизмов, позволяя одновременно проводить анализ сразу всех таксонов бактерий. Ранее было продемонстрировано, что высокопроизводительное секвенирование способно выявить потенциально опасные микроорганизмы в различных субстратах. Был проведен анализ бактериального состава кисломолочных продуктов и сыров с помощью высокопроизводительного секвенирования. В йогуртах наиболее обильно представлены бактерии из родов *Streptococcus* и *Lactococcus*. Были обнаружены роды бактерий, которые не должны содержаться в йогуртах в норме: *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp. и *Staphylococcus* sp. Кроме того, были обнаружены условно-патогенные бактерии родов *Enterobacter* и *Escherichia*. В плавленом сыре было наиболее разнообразное микробное сообщество. Также были обнаружены роды бактерий, которые в норме не должны содержаться в плавленом сыре: *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. и *Enterococcus* sp. Также были обнаружены условно-патогенные бактерии родов *Proteus* (7,31%), *Klebsiella* (3,94%), *Escherichia* (2,56%). В творогах наиболее обильными были бактерии из родов *Lactococcus*, *Lactobacillus* и *Streptococcus*. Были обнаружены роды бактерий, которые в норме не должны содержаться в творогах: *Acetobacter* sp., *Acinetobacter* sp. и *Lysinibacillus* sp. Несмотря на то, что в исследованных продуктах в наибольших относительных количествах были выявлены молочнокислые бактерии, полученные данные свидетельствуют о том, что, необходим более строгий подход к контролю качества кисломолочной продукции. Почти во всех продуктах, которые подвергались анализу, присутствовали условно-патогенные бактерии.

Ключевые слова: кисломолочная продукция, высокопроизводительное секвенирование, бактерии, идентификация, условно-патогенные микроорганизмы

Analysis of the bacterial composition of fermented milk products using high-throughput sequencing

Mikhail Yu. Syromyatnikov^{1,2} mihan.vrn@mail.ru  0000-0001-9018-0613

1 Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

2 Voronezh State University, Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia

Abstract. Contamination by microorganisms of food products leads to a change in their texture, taste and aroma, significantly reduces the shelf life. The development of high-throughput DNA analysis methods has made it possible to improve the screening of microorganisms, allowing simultaneous analysis of all bacterial taxa at once. It has previously been demonstrated that high-throughput sequencing is able to identify potentially dangerous microorganisms in various substrates. The bacterial composition of fermented dairy products and cheeses was analyzed using high-throughput sequencing. In yoghurts, bacteria from the genera *Streptococcus* and *Lactococcus* are most abundantly represented. Genera of bacteria were found that should not be contained in yoghurts normally: *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp. and *Staphylococcus* sp. In addition, opportunistic bacteria of the genera *Enterobacter* and *Escherichia* were found. The processed cheese had the most diverse microbial community. Genera of bacteria that normally should not be contained in processed cheese were also found: *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. and *Enterococcus* sp. Opportunistic bacteria of the genera *Proteus* (7.31%), *Klebsiella* (3.94%) and *Escherichia* (2.56%) were also found. Bacteria from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* were the most abundant in cottage cheese. Genera of bacteria were found that normally should not be contained in cottage cheese: *Acetobacter* sp., *Acinetobacter* sp. and *Lysinibacillus* sp. Despite the fact that lactic acid bacteria were detected in the studied products in the largest relative abundance, the data obtained indicate that a stricter approach to quality control of fermented milk products is needed. Opportunistic bacteria were present in almost all the products that were analyzed.

Keywords: fermented dairy products, high-throughput sequencing, bacteria, identification, opportunistic microorganisms

Введение

Весомый вклад микробных сообществ во множество процессов различных отраслей, включая сельское хозяйство и пищевую промышленность, способствует их активному исследованию со всех возможных ракурсов [1].

Однако широкое многообразие видов, населяющих различные среды обитания, а также сравнительно небольшое количество культивированных видов, затрудняет их изучение классическими методами [2]. Развитие высокопроизводительных методов анализа ДНК привело к усовершенствованию скрининга микроорганизмов [3].

Для цитирования

Сыромятников М.Ю. Анализ бактериального состава кисломолочной продукции с помощью высокопроизводительного секвенирования // Вестник ВГУИТ. 2021. Т. 83. № 4. С. 126–130. doi:10.20914/2310-1202-2021-4-126-130

For citation

Syromyatnikov M.Yu. Analysis of the bacterial composition of fermented milk products using high-throughput sequencing. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2021. vol. 83. no. 4. pp. 126–130. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2021-4-126-130

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License

Общий принцип функционирования методов высокопроизводительного секвенирования сводится к созданию ДНК-библиотек, их иммобилизации на микросферах или проточных ячейках, амплификации, гибридизации с праймерами и непосредственно самим секвенированием. Ключевым преимуществом метода является то, что за один запуск можно анализировать сразу множество участков генома [4]. При этом особенно актуально использование рибосомальных генов в качестве маркеров, позволяющих дифференцировать микроорганизмы и целые микробные сообщества [5]. Подавляющее большинство бактерий характеризуются присутствием в геноме гена 16S рРНК. Высокопроизводительное секвенирование позволяет выявлять потенциально опасные микроорганизмы (такие как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и *Salmonella enterica*) [6].

Загрязнение продуктов питания микроорганизмами приводит к изменению их текстуры, аромата и вкуса, сокращает срок хранения [7]. Ранее с помощью высокопроизводительного секвенирования удалось выявить *Bacillus cereus* в составе сыра. Наличие спор *Bacillus cereus* способствуют его порче, сокращая срок годности продукции [8]. Стерильность и чистота производства – важные составляющие качества продукта [7]. Так, было установлено, что вероятность порчи продуктов бактериями *Pseudomonas* sp., *Psychrobacter* sp., *Acinetobacter* sp. напрямую связано с наличием этих бактерий в окружающей производственной обстановке [9].

Также было показано, что высокопроизводительное секвенирование может быть использовано для оценки относительных количеств и свойств молочнокислых бактерий [10-13]. Высокопроизводительное секвенирование широко используется для количественной оценки бактерий в ферментированных продуктах [14-19].

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали образцы питьевого йогурта, густого йогурта, творога, творожной массы и сливочного плавленого сыра.

ДНК выделяли с помощью набора ZymoBIOMICS DNA Microprep Kit (Zymo research, США) в соответствии с рекомендациями производителя (https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4301_d4305_zymbiomics_dna_microprep_kit.pdf).

Бактериальную ДНК амплифицировали с помощью универсального прямого праймера 785F (GGATTAGATACCCTGGTA) и обратного праймера 1100R (GGGTTGCGCTCGTTG) [20].

ПЦР проводили на 5X ScreenMix-HS Master Mix (Евроген, Россия) в следующем режиме: 94 °С, 4 мин, затем 37 циклов: 94 °С, 30 сек, 53 °С, 30 сек, 72 °С. в течение 30 сек с окончательной элонгацией при 72 °С в течение 5 мин.

Продукты ПЦР очищали с помощью магнитных шариков AMPure XP (Beckman Coulter, США) и использовали для построения библиотек секвенирования с использованием набора Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Штрих-кодирование производилось с помощью адаптеров штрих-кода Ion Xpress (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию ДНК в библиотеке определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием набора для количественного анализа библиотек Ion Torrent Platforms (Капа Biosystems, США).

Секвенирование проводили в системе IonTorrent PGM с использованием набора для секвенирования Ion PGM Hi-Q View, системы Ion OneTouch 2 и набора Ion PGM Hi-Q View OT2 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты и обсуждение

Для оценки относительной обильности бактерий в исследуемых продуктах оценивали соотношение ридов, полученных в ходе проведения высокопроизводительного секвенирования, для разных OTU.

На рисунке 1 изображена диаграмма, отражающая соотношение бактерий в образце питьевого йогурта №1.

Наиболее обильными были бактерии из родов *Lactococcus* и *Streptococcus* – 23,79% и 48,39% соответственно. Это является нормальной микрофлорой для йогуртов. Были обнаружены роды бактерий, которые в норме не должны содержаться в йогуртах: *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp. Кроме того, были обнаружены условно-патогенные бактерии родов *Escherichia* и *Enterobacter*. Также были исследованы бактериальный состав густого йогурта (рисунок 2).

Наиболее обильными были бактерии из родов *Lactobacillus* и *Streptococcus* – 19,81% и 56,77% соответственно. Это является нормальной микрофлорой для йогуртов. Так же как и в питьевого йогурта, в не питьевого йогурта были обнаружены роды бактерий, которые в норме не должны содержаться: *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp. Были обнаружены в значительных количествах условно-патогенные бактерии рода *Enterobacter*.

Далее был проведен анализ микрофлоры плавленого сыра. На рисунке 3 изображена диаграмма, отражающая микробиологический состав плавленого сыра.

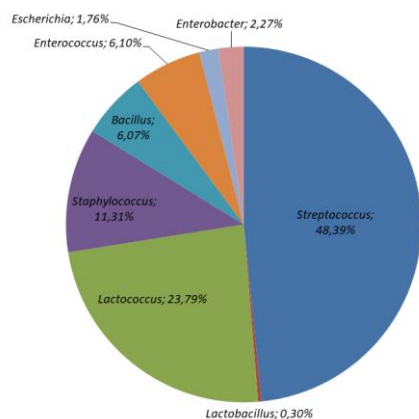


Рисунок 1. Соотношение родов бактерий в питьевом йогурте

Figure 1. Ratio of bacterial genera in drinking yogurt

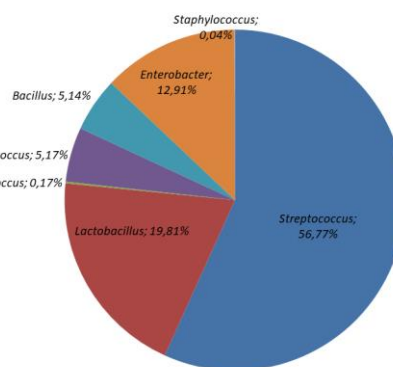


Рисунок 2. Соотношение родов бактерий в густом йогурте

Figure 2. The ratio of bacterial genera in thick yogurt

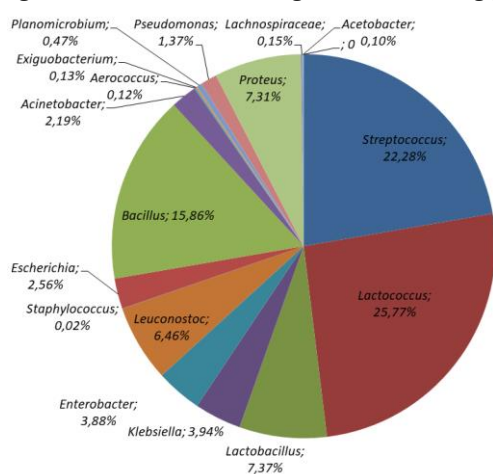


Рисунок 3. Соотношение родов бактерий в плавленом сыре

Figure 3. Ratio of bacterial genera in processed cheese

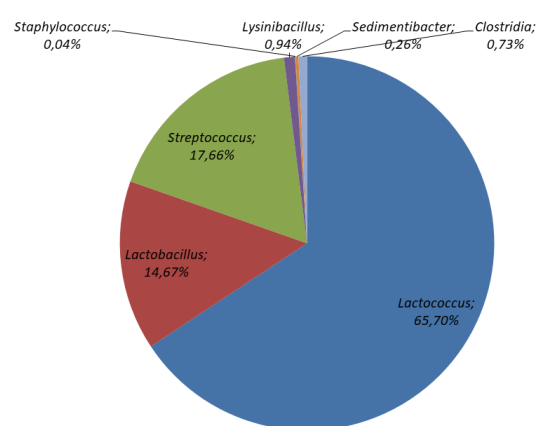


Рисунок 4. Соотношение родов бактерий в классическом твороге

Figure 4. The ratio of bacterial genera in classic cottage cheese

Наблюдалось большое биоразнообразие бактерий в плавленом сыре. Наиболее обильными были бактерии из родов *Streptococcus* и *Lactobacillus* – 22,28% и 25,77% соответственно. Были обнаружены роды бактерий, которые в норме не должны содержаться в плавленом сыре: *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp. Также были обнаружены условно-патогенные бактерии родов *Proteus* (7,31%), *Klebsiella* (3,94%), *Escherichia* (2,56%).

Кроме того, была проанализирована микрофлора творога. На рисунке 4 изображена диаграмма, отражающая микробиологический состав классического творога.

Наиболее обильными были бактерии из родов *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*– 65,70%, 17,66% и 14,67% соответственно. Были обнаружены роды бактерий, которые в норме не должны содержаться в творогах: *Lysinibacillus* sp. и *Staphylococcus* sp. Кроме того, были обнаружены условно-патогенные бактерии рода *Clostridia* (0,73%).

На рисунке 5 изображена диаграмма, отражающая микробиологический состав творожной массы.

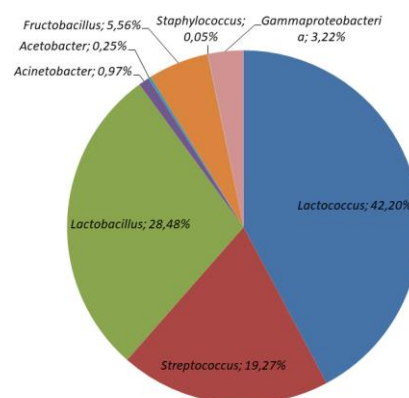


Рисунок 5. Соотношение родов бактерий в творожной массе

Figure 5. The ratio of bacterial genera in the curd mass

Наиболее обильными были нормальные для творожной массы бактерии из родов *Lactococcus*, *Lactobacillus* и *Streptococcus* – 42,20%, 28,48% и 19,27% соответственно. Были обнаружены роды бактерий, которые в норме не должны содержаться в творожной массе: *Acetobacter* sp., *Acinetobacter* sp. и *Staphylococcus* sp. Однако их относительное содержание было менее 1%. Условно-патогенные бактерии не обнаружены.

Заключение

В ходе анализа кисломолочной продукции были выявлены как бактерии нормальной микрофлоры, такие как *Lactococcus*, *Lactobacillus* и *Streptococcus*, так и бактерии,

которые в норме не должны присутствовать в продукте, среди которых самыми распространенными были *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. и *Enterococcus* sp. Также были идентифицированы условно-патогенные бактерии родов *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella* и *Enterobacter*, которые обсеменяли йогурты и плавленый сыр.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука» (проект FZGW-2020-0001, уникальный номер реестра государственных заданий 075001X39782002)

Литература

- 1 Fenchel T., King G.M., Blackburn T.H. Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling // Bacterial biogeochemistry. 2012. P. 303.
- 2 Angeletti S., Chroma M., Kolar M. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology // Journal of Microbiological Methods. 2017. V. 138. P. 20-29.
- 3 Norman J.M., Handley S.A., Virgin H.W. Kingdom-Agnostic Metagenomics and the Importance of Complete Characterization of Enteric Microbial Communities // Gastroenterology. 2014. V. 146. N. 6. P. 1459-1469.
- 4 Bokulich N.A., Mills D.A. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations // BMB Reports. 2012. V. 45. №. 7. P. 377-389.
- 5 Srinivasan R., Karaoz U., Volegova M. et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens // Plos One. 2015. V. 10. №. 2. P. e0117617. doi: 10.1371/journal.pone.0117617.
- 6 Kechin A., Borobova V., Boyarskikh U. et al. NGS-PrimerPlex: High-throughput primer design for multiplex polymerase chain reactions // PLOS Computational Biology. 2020. V. 16. №. 12. P. e1008468.
- 7 Remenant B., Jaffrès E., Dousset X. et al. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties // Food Microbiology. 2015. V. 45. P. 45-53. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.009.
- 8 Sattin E., Andreani N.A., Carraro L. et al. Microbial dynamics during shelf-life of industrial Ricotta cheese and identification of a *Bacillus* strain as a cause of a pink discolouration // Food Microbiology. 2016. V. 57. P. 8-15.
- 9 Odeyemi O.A., Alegbeleye O.O., Strateva M. et al. Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2020. V. 19. №. 2. P. 311-331.
- 10 Markusková B., Lichvariková A., Szemes T. et al. Genome analysis of lactic acid bacterial strains selected as potential starters for traditional Slovakian bryndza cheese // FEMS Microbiology Letters. 2018. V. 365. №. 23. doi: 10.1093/femsle/fny257.
- 11 Bergsveinson J., Kajala I., Ziola B. Next-generation sequencing approaches for improvement of lactic acid bacteria-fermented plant-based beverages // AIMS Microbiol. 2017. V. 3. №. 1. P. 8-24. doi: 10.3934/microbiol.2017.1.8.
- 12 Douillard F.P., de Vos W.M. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health // Microbial Cell Factories. 2014. V. 13. P. S8. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S8
- 13 Seol D., Jhang S.Y., Kim H. et al. Accurate and strict identification of probiotic species based on coverage of whole-metagenome shotgun sequencing data // Frontiers in Microbiology. 2019. V. 10. P. 1683. doi: 10.3389/fmicb.2019.01683
- 14 Sessou P., Keisam S., Tuikhar N. An updated review on bacterial community composition of traditional fermented milk products: what next-generation sequencing has revealed so far? // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019. P. 1-20. doi: 10.1080/10408398.2020.1848787.
- 15 Pini F., Aquilani C., Giovannetti L. et al. Characterization of the microbial community composition in Italian Cinta Senese sausages dry-fermented with natural extracts as alternatives to sodium nitrite // Food Microbiology. 2020 V. 89. P. 103417. doi: 10.1016/j.fm.2020.103417.
- 16 Argyri K., Doulgeraki A.I., Manthou E. et al. Microbial diversity of fermented Greek table olives of halkidiki and konservolia varieties from different regions as revealed by metagenomic analysis // Microorganisms. 2020. V. 8. №. 8. P. 1241. doi: 10.3390/microorganisms8081241.
- 17 Bastami M.S., Jones D.L., Chadwick D.R. Microbial diversity dynamics during the self-acidification of dairy slurry // Environmental Technology. 2021. V. 42. №. 16. P. 2562-2572. doi: 10.1080/09593330.2019.1706644.
- 18 Liu X., Kuda T., Takahashi H. et al. Bacterial and fungal microbiota of spontaneously fermented Chinese products, Rubing milk cake and Yan-cai vegetable pickles // Food Microbiology. 2018. V. 72. P. 106-111. doi: 10.1016/j.fm.2017.11.014.
- 19 Sessou P., Keisam S., Tuikhar N. et al. High-throughput illumina MiSeq amplicon sequencing of yeast communities associated with indigenous dairy products from republics of Benin and Niger // Frontiers in Microbiology. 2019. V. 10. P. 594. doi: 10.3389/fmicb.2019.00594.
- 20 Techo S., Shiwa Y., Tanaka N. et al. *Enterococcus florum* sp. nov., isolated from a cotton flower (*Gossypium hirsutum* L.) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2019. V. 69. №. 8. P. 2506-2513.

References

- 1 Fenchel T., King G.M., Blackburn T.H. Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling. Bacterial biogeochemistry. 2012. pp. 303.
- 2 Angeletti S., Chroma M., Kolar M. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. Journal of Microbiological Methods. 2017. vol. 138. pp. 20-29.
- 3 Norman J.M., Handley S.A., Virgin H.W. Kingdom-Agnostic Metagenomics and the Importance of Complete Characterization of Enteric Microbial Communities. Gastroenterology. 2014. vol. 146. no. 6. pp. 1459-1469.
- 4 Bokulich N.A., Mills D.A. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. BMB Reports. 2012. vol. 45. no. 7. pp. 377-389.
- 5 Srinivasan R., Karaoz U., Volegova M. et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. Plos One. 2015. vol. 10. no. 2. pp. e0117617. doi: 10.1371/journal.pone.0117617.
- 6 Kechin A., Borobova V., Boyarskikh U. et al. NGS-PrimerPlex: High-throughput primer design for multiplex polymerase chain reactions. PLOS Computational Biology. 2020. vol. 16. no. 12. pp. e1008468.
- 7 Remenant B., Jaffrès E., Dousset X. et al. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. Food Microbiology. 2015. vol. 45. pp. 45-53. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.009.
- 8 Sattin E., Andreani N.A., Carraro L. et al. Microbial dynamics during shelf-life of industrial Ricotta cheese and identification of a Bacillus strain as a cause of a pink discoloration. Food Microbiology. 2016. vol. 57. pp. 8-15.
- 9 Odeyemi O.A., Alegbeleye O.O., Strateva M. et al. Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2020. vol. 19. no. 2. pp. 311-331.
- 10 Markusková B., Lichvariková A., Szemes T. et al. Genome analysis of lactic acid bacterial strains selected as potential starters for traditional Slovakian bryndza cheese. FEMS Microbiology Letters. 2018. vol. 365. no. 23. doi: 10.1093/femsle/fny257.
- 11 Bergsveinson J., Kajala I., Ziola B. Next-generation sequencing approaches for improvement of lactic acid bacteria-fermented plant-based beverages. AIMS Microbiol. 2017. vol. 3. no. 1. pp. 8-24. doi: 10.3934/microbiol.2017.1.8.
- 12 Douillard F.P., de Vos W.M. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. Microbial Cell Factories. 2014. vol. 13. pp. S8. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S8
- 13 Seol D., Jhang S.Y., Kim H. et al. Accurate and strict identification of probiotic species based on coverage of whole-metagenome shotgun sequencing data. Frontiers in Microbiology. 2019. vol. 10. pp. 1683. doi: 10.3389/fmicb.2019.01683
- 14 Sessou P., Keisam S., Tuikhar N. An updated review on bacterial community composition of traditional fermented milk products: what next-generation sequencing has revealed so far? Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019. pp. 1-20. doi: 10.1080/10408398.2020.1848787.
- 15 Pini F., Aquilani C., Giovannetti L. et al. Characterization of the microbial community composition in Italian Cinta Senese sausages dry-fermented with natural extracts as alternatives to sodium nitrite. Food Microbiology. 2020. vol. 89. pp. 103417. doi: 10.1016/j.fm.2020.103417.
- 16 Argyri K., Doulgeraki A.I., Manthou E. et al. Microbial diversity of fermented Greek table olives of halkidiki and konservolia varieties from different regions as revealed by metagenomic analysis. Microorganisms. 2020. vol. 8. no. 8. pp. 1241. doi: 10.3390/microorganisms8081241.
- 17 Bastami M.S., Jones D.L., Chadwick D.R. Microbial diversity dynamics during the self-acidification of dairy slurry. Environmental Technology. 2021. vol. 42. no. 16. pp. 2562-2572. doi: 10.1080/09593330.2019.1706644.
- 18 Liu X., Kuda T., Takahashi H. et al. Bacterial and fungal microbiota of spontaneously fermented Chinese products, Rubing milk cake and Yan-cai vegetable pickles. Food Microbiology. 2018. vol. 72. pp. 106-111. doi: 10.1016/j.fm.2017.11.014.
- 19 Sessou P., Keisam S., Tuikhar N. et al. High-throughput illumina MiSeq amplicon sequencing of yeast communities associated with indigenous dairy products from republics of Benin and Niger. Frontiers in Microbiology. 2019. vol. 10. pp. 594. doi: 10.3389/fmicb.2019.00594.
- 20 Techo S., Shiwa Y., Tanaka N. et al. Enterococcus florum sp. nov., isolated from a cotton flower (Gossypium hirsutum L.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2019. vol. 69. no. 8. pp. 2506-2513.

Сведения об авторах

Михаил Ю. Сыромятников к.б.н., в.н.с., доцент, лаборатория метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, mihan.vrn@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-9018-0613>

Information about authors

Mikhail Yu. Syromyatnikov Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, associate professor, laboratory of metagenomics and food biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, mihan.vrn@mail.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-9018-0613>

Вклад авторов

Михаил Ю. Сыромятников написал рукопись, редактировал её до подачи в редакцию и несет ответственность за плагиат

Contribution

Mikhail Yu. Syromyatnikov wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Поступила 15/10/2021	После редакции 02/11/2021	Принята в печать 24/11/2021
Received 15/10/2021	Accepted in revised 02/11/2021	Accepted 24/11/2021