



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.113

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12517

Выделение нуклеиновых кислот из фекалий с помощью сорбента на основе диоксида кремния для идентификации новых пробиотических агентов

Екатерина Юрьевна Нестерова^{1,2}, Мария Ивановна Гладких¹,
Алина Сергеевна Завалюева^{1,2}, Михаил Юрьевич Сыромятников^{1,2}✉

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия,
mihan.vrn@mail.ru✉

²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. Одним из основных этапов молекулярно-генетических исследований является экстракция нуклеиновых кислот. Методика выделения ДНК/РНК, основанная на сорбции, зарекомендовала себя как успешная и популярная технология. Выделение нуклеиновых кислот из комплексных субстратов, таких как фекалии, может представлять проблему. Известно, что фекалии содержат в своем составе новые пробиотические агенты, такие как *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila*, которые обладают широким спектром биологических активностей. Работа посвящена оценке эффективности экстракции ДНК и РНК из фекалий с помощью силики (диоксид кремния) как сорбента для нуклеиновых кислот с добавлением в качестве детергента в составе лизирующего раствора Triton X-100, Tween 20, Tween 80 и Pluronic P123 в концентрациях 1, 3, 5 и 10%. Электрофорез в агарозном геле показал, что увеличение концентрации детергента провоцировало рост интенсивности свечения полос, соответствующих как ДНК, так и РНК. Самые большие значения концентрации РНК были характерны для 10% Tween 80 и 5% Triton X-100. При этом с увеличением концентрации детергента фиксировалось увеличение выхода РНК. Максимальные значения концентрации ДНК были зарегистрированы при использовании Tween 20. Данные согласуются с результатами, полученными на основе Real-Time PCR. Показано, что использование детергента Tween 20 наиболее оптимально для выделения ДНК из фекальных бактерий *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila*.

Ключевые слова: экстракция ДНК, диоксид кремния, пробиотические агенты, детергент, Real-time PCR.

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20036, <https://rscf.ru/project/24-24-20036>.

Для цитирования: Нестерова Е.Ю., Гладких М.И., Завалюева А.С., Сыромятников М.Ю. Выделение нуклеиновых кислот из фекалий с помощью сорбента на основе диоксида кремния для идентификации новых пробиотических агентов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 5. С. 786-794. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12517>

Original article

Isolation of nucleic acids from feces using a silica-based sorbent for the identification of new probiotic agents

Ekaterina Yu. Nesterova^{1,2}, Maria I. Gladkikh^{1,2}, Alina S. Zavalyueva^{1,2},
Mikhail Yu. Syromyatnikov^{1,2}✉

¹Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, mihan.vrn@mail.ru✉

²Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Abstract. One of the main stages of molecular genetic research is the extraction of nucleic acids. The sorption-based DNA/RNA isolation technique has proven to be a successful and popular technology. The isolation of



nucleic acids from complex substrates such as feces can be a problem. Feces are known to contain novel probiotic agents such as *Faecalibacterium prausnitzii* and *Akkermansia muciniphila*, which have a wide range of biological activities. The work is devoted to evaluating the effectiveness of DNA and RNA extraction from feces using silica (silicon dioxide) as a sorbent for nucleic acids, with the addition of Triton X-100, Tween 20, Tween 80 and Pluronic P123 as a detergent in the lysing solution in concentrations of 1, 3, 5 and 10%. Electrophoresis in agarose gel showed that an increase in the concentration of detergent provoked an increase in the intensity of the glow bands characteristic of both DNA and RNA. The highest RNA concentrations were typical for 10% Tween 80 and 5% Triton X-100. At the same time, with an increase in the concentration of detergent, a greater RNA yield was observed. The maximum values of DNA concentration were observed using Tween 20 as detergent. The data are consistent with the results obtained based on Real-Time PCR. It has been shown that the use of Tween 20 detergent is most optimal for DNA isolation from fecal bacteria *Faecalibacterium prausnitzii* and *Akkermansia muciniphila*.

Keywords: DNA extraction, silicon dioxide, probiotic agents, detergent, Real-time PCR.

Acknowledgments: the research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 24-24-20036, <https://rscf.ru/project/24-24-20036>.

For citation: Nesterova E.Yu., Gladkikh M.I., Zavaluyeva A.S., Syromyatnikov M.Yu. Isolation of nucleic acids from feces using a silica-based sorbent for the identification of new probiotic agents. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(5): 786-794. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12517>

Введение

Повышенное внимание к методологии процесса экстракции бактериальной ДНК из фекалий человека связано с важностью данного этапа при изучении микробиома с помощью различных молекулярно-генетических подходов [1]. В зависимости от выбранной методики выделения нуклеиновых кислот могут регулироваться и оптимизироваться количественные и качественные характеристики ДНК. Поскольку в составе фекалий присутствуют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, а также различные ингибиторы, препятствующие дальнейшему анализу образцов, выбор методики выделения нуклеиновых кислот является важным аспектом при проведении исследований профиля кишечного микробиома [2]. На сегодняшний день существует большое разнообразие технологий экстракции нуклеиновых кислот, начиная с фенол-хлороформного протокола и заканчивая методами выделения на колонках с силикагелевой мембраной [3].

Состав классического набора для экстракции нуклеиновых кислот представлен растворами, в число которых входят лизирующий, промывочный и элюирующий. Основным компонентом лизирующего раствора является гуанидин тиоцианат, который совместно с детергентом

способствует разрушению клеточной мембраны, органелл и высвобождению нуклеиновой кислоты в буфер. Самыми распространенными детергентами принято считать Triton, Tween, SDS и ЦТАБ [4-7]. Отмывка выделяемой ДНК/РНК чаще всего состоит из нескольких этапов и представлена несколькими растворами [8].

В зависимости от метода выделения нуклеиновых кислот протокол экстракции нуклеиновых кислот может включать раствор для преципитации ДНК/РНК или же сорбент. Последний представляет собой диоксид кремния и может быть использован как для заполнения колонки, так и в качестве взвеси в растворе. Следует отметить, что метод выделения нуклеиновых кислот, основанный на их сорбции, является самым распространенным и зарекомендовавшим себя [9]. Принцип технологии твердофазной экстракции заключен в селективном связывании высоко аффинного отрицательно заряженного остова молекулы ДНК/РНК с положительно заряженным диоксидом кремния. Такая прочная связь нуклеиновой кислоты с неорганическим носителем способствует ее хорошей отмывке от примесей и ингибиторов. В конечном итоге на выходе получается высокоочищенная молекула ДНК/РНК, которая может быть использована для дальнейших

молекулярно-генетических исследований [10-12].

При выделении нуклеиновых кислот из фекалий важной задачей может являться получение ДНК и РНК новых пробиотических агентов, таких как *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila*, ввиду их особой важности как маркера различных заболеваний кишечника [13-16]. Увеличение численности *A. muciniphila* способствует нормализации метаболизма у людей, страдающих ожирением. Бактерии учувствуют в регуляции эндоканнабиноидной системы, что позволяет положительно влиять на протекание воспалительных процессов в организме, вызванных сахарным диабетом 2 типа [14]. Вырабатываемый *F. prausnitzii* бутират, наделяет бактерии противовоспалительными функциями, применяемыми при лечении колитов. Помимо этого, бактерии способствуют поддержанию целостности кишечного барьера путём выработки особых белков и слизи [13,15]. Поэтому предполагается, что бактерии *A. muciniphila* и *F. prausnitzii* являются пробиотиками нового поколения. При этом полностью отсутствуют публикации, посвященные выделению нуклеиновых кислот из этих бактерий, что является необходимым этапом любых молекулярно-генетических исследований.

Цель нашего исследования – разработать наиболее оптимальный способ выделения ДНК из фекалий на основе сорбционного метода, позволяющего изолировать ДНК и РНК новых пробиотических агентов.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования были использованы фекалии человека, в которых предварительно с помощью секвенирования (не опубликованные данные) были идентифицированы бактерии *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila*.

Лизирующий раствор для экстракции ДНК состоял из гуанидин тиоционата,

трис-НСI, ЭДТА и детергента (см. ниже) при кислотности среды 6.4 [17]. Ранее нами было показано, что оптимальная концентрация гуанидин тиоционата составляет 5.0 М [18]. В качестве сорбента использовали коммерчески доступную силику (диоксид кремния) (Sigma-Aldrich, США). В рамках эксперимента рассматривались 4 варианта детергентов, относящихся к неионогенным поверхностно активным веществам: производное полиэтиленгликоля Triton X-100, полисорбаты Tween 20 и Tween 80, различающиеся типом жирных кислот, связанных с фрагментом полиоксиэтилен сорбитана, и блоксополимер полиэтиленоксид-полипропиленоксид-полиэтиленоксида Pluronic P123. Детергенты добавлялись в лизирующий раствор с разной концентрацией – 1, 3, 5, 10%. Таким образом, экстракция ДНК осуществлялась 16 различными вариантами выделительных систем.

ДНК, полученную после экстракции, визуализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Измерение концентрации проводили с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием Taq-полимеразы на приборе Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). Смешивали в пробирке следующие компоненты: 5X реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) – 5 мкл; 5 мкМ прямой праймер – 1 мкл; 5 мкМ обратный праймер – 1 мкл; ДНК – 2 мкл; деионизированная вода – до 25 мкл. Использовали следующий температурный цикл: 94°C 4 мин, 40 циклов: 94°C 20 сек 59°C 30 сек, 72°C 30 сек. В качестве праймеров использовали 337F GACTCCTACGGGAGGCWGCAG и 518R GTATTACCGCGGCTGCTGG [19]. Для анализа образцов на наличие бактерий видов *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila* были использованы специфичные к бактериям зонды и

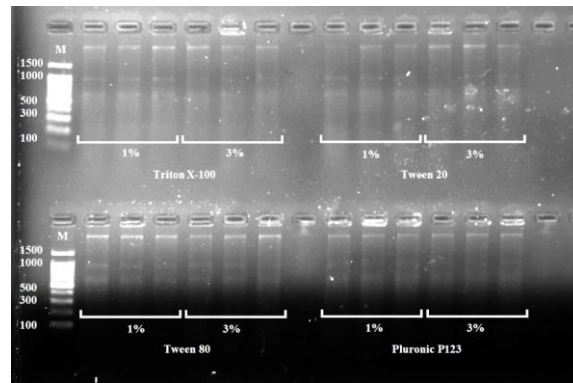


Рис. 1. Электрофореграмма фрагментов нуклеиновых кислот, полученных в результате экстракции с использованием детергентов Triton X-100 1 и 3%, Tween 20 1 и 3%, Tween 80 1 и 3%, Pluronic P123 1 и 3%. М – маркер известной длины.

Fig. 1. Electrophoregram of nucleic acid fragments obtained as a result of extraction using detergents Triton X-100 1 and 3%, Tween 20 1 and 3%, Tween 80 1 and 3%, Pluronic P123 1 and 3%. M is a marker of known length.

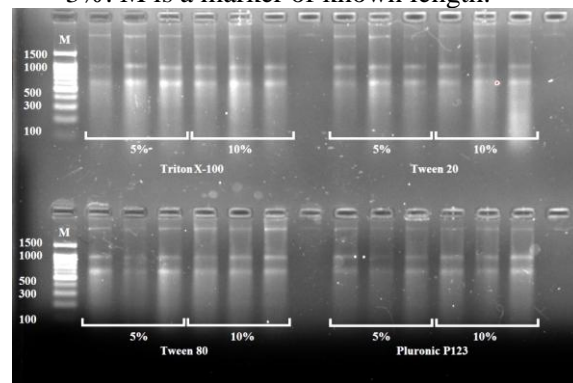


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов нуклеиновых кислот, полученных в результате экстракции с использованием детергентов Triton X-100 5 и 10%, Tween 20 5 и 10%, Tween 80 5 и 10%, Pluronic P123 5 и 10%. М – маркер известной длины.

Fig. 2. Electrophoregram of nucleic acid fragments obtained as a result of extraction using detergents Triton X-100 5 and 10%, Tween 20 5 and 10%, Tween 80 5 and 10%, Pluronic P123 5 and 10%. M is a marker of known length.

праймеры. Смешивали в пробирке следующие компоненты: 5X реакционная смесь qPCRmix-HS (Евроген, Россия) – 6 мкл; 5 мкМ прямой праймер – 1 мкл; 5 мкМ обратный праймер – 1 мкл; ДНК – 2 мкл; деионизированная вода – до 25 мкл. Использовали следующий температурный цикл: 94°C 4 мин, 40 циклов: 94°C 20 сек 58°C 30 сек, 72°C 30 сек. Для расчетов относительного количества бактерий оценивали *St* полимеразной цепной реакции со специфичными к новым пробиотическим агентам олигонуклеотидами и универсальными к бактериям олигонуклеотидам, по формуле, разработанной ранее [20].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием дисперсионного анализа ANOVA в программе STATISTICA.

Обсуждение результатов

На первом этапе исследования качество экстрагируемой ДНК было проверено с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Установлено, что характерный рисунок ДНК присутствовал на электрофореграммах со всеми используемыми детергентами (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 и Pluronic P123) (рис. 1). Полученные результаты указывают на успешное выделение нуклеиновой кислоты наборами со всеми детергентами и

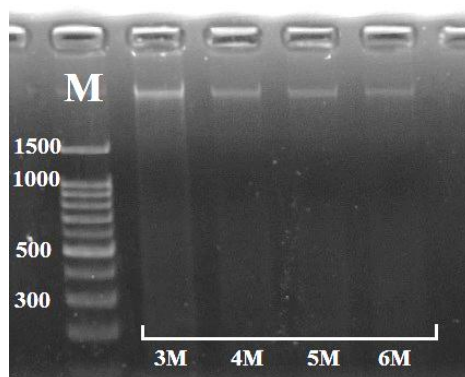


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов нуклеиновых кислот, полученных в результате экстракции без использования детергентов: М – маркер известной длины.

Fig. 3. Electrophoregram of fragments of nucleic acids obtained as a result of extraction without the use of detergents: M - marker of known length.

вариантами их концентраций. Установлено, что с увеличением концентрации детергента росла интенсивность свечения полос, характерных не только для молекулы ДНК, но и для РНК (рис. 2). Анализ электрофореграмм позволил сделать вывод о том, что набор, в состав которого входил детергент Tween 80 с концентрациями 1 и 3%, позволяет лучше других экстрагировать ДНК.

Примечательно, что использование лизирующего раствора без добавления детергентов позволяет выделить ДНК, но не РНК. Результаты экстракции нуклеиновых кислот с использованием гуанидин тиоцианата различной молярности (3, 4, 5 и 6М), но без добавления детергентов представлены на рисунке 3.

При использовании в качестве хаотропного агента гуанидин тиоцианата без добавления детергента концентрация ДНК варьировала от 3.87 ± 1.58 нг/мкл (при концентрации гуанидин тиоцианата 6М) до 7.30 ± 2.98 нг/мкл (при концентрации гуанидин тиоцианата 3М). Таким образом, отсутствие детергентов в целом обеспечивает выделение ДНК из фекалий, но при этом не позволяет изолировать РНК.

Следующим этапом анализа стала оценка концентрации ДНК и РНК, которые удалось экстрагировать с помощью наборов на основе сорбции с различными вариантами детергентов. На рисунке 4

представлена гистограмма зависимости применяемых детергентов и их концентрации от концентрации выделенной ДНК. Установлено, что с ростом концентрации детергентов наблюдалась тенденция увеличения концентрации ДНК. В присутствии 10% детергента Triton X-100 концентрация ДНК была выше в 1.4 раза по сравнению с концентрацией того же детергента 1%. А в присутствии 10% детергента Tween 80 концентрация ДНК была выше в 1.5 раза по сравнению с концентрацией этого же детергента 1%. Для других образцов достоверных различий установлено не было. Самые высокие значения концентрации выделенной ДНК получены при использовании в качестве детергента Tween 20. Видимая тенденция роста концентрации ДНК при увеличении процентности детергента была зарегистрирована в случае использования Triton X-100. Что касается детергентов Tween 80 и Pluronic P123, то можно сказать о неоднозначности полученных результатов, с ростом концентрации детергента увеличение концентрации ДНК регистрировалось не для всех образцов. Например, при экстракции с 1% Tween 80 концентрация ДНК составила 5.7 нг/мкл, а при 5% Tween 80 – 5.4 нг/мкл, при том, что в случае применения 3 и 10% Tween 80 значения концентрации составили 7.4 и 8.6 нг/мкл соответственно.

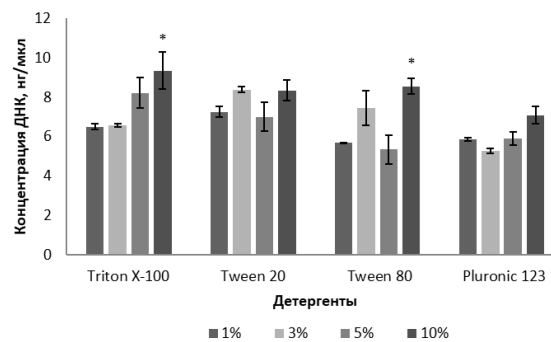


Рис. 4. Зависимость концентрации экстрагированной ДНК от концентрации детергентов. *различия в концентрации ДНК относительно 1% концентрации того же детергента статистически достоверны

Fig. 4. Dependence of the concentration of extracted DNA on the concentration of detergents. *differences in DNA concentration relative to 1% concentration of the same detergent are statistically significant

На рисунке 5 изображена зависимость концентраций экстрагируемой РНК от разновидности детергента и его концентраций. Установлено, что набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот на основе сорбции помимо ДНК эффективно экстрагирует и РНК. Более того, значения концентраций значительно выше для РНК, чем для ДНК. Так, например, среднее значение концентрации экстрагируемой РНК со всеми детергентами составило 14.5 нг/мкл, в то время как для ДНК – 7.0 нг/мкл. Самые большие значения концентрации РНК были характерны для 10% Tween 80 и 5% Triton X-100. Полученные значения составили 22.8 ± 0.5 и 20 ± 2 нг/мкл соответственно. Концентрация РНК при выделении с 5% детергентом Triton X-100 была выше в 2.0 раза по сравнению с 1% концентрацией того же детергента. Концентрация РНК при выделении с 10% детергентом Tween 80 была выше в 1.9 раза по сравнению с 1% концентрацией того же детергента. При этом зафиксирован большой выход РНК при увеличении концентрации детергента, что согласуется с результатами электрофореза.

На третьем этапе образцы ДНК, полученные в ходе экстракции нуклеиновых кислот с детергентами Triton X-100, Tween 20, Tween 80 и Pluronic P123 в кон-

центрациях 1 и 5%, были подвержены реакции амплификации в реальном времени. Были получены значения относительного содержания бактерий *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila* в исследуемых образцах.

В таблице 1 представлены подробные результаты анализа микробного состава кала на наличие бактерий *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila* с помощью Real-Time PCR.

Анализ относительного содержания бактерий *Faecalibacterium prausnitzii* в исследуемых образцах кала показал, что наибольшее значение относительного содержания бактерий было характерно для набора, в котором в качестве детергента выступал 1% Tween 20 ($0.10 \pm 0.01\%$). Остальные варианты детергентов позволили получить результаты, варьирующие от 0.01 до 0.08 %.

Аналогичная ситуация наблюдалась и при исследовании *Akkermansia muciniphila*. Экстракция на основе 1% Tween 20 позволила зарегистрировать высокий уровень относительного содержания бактерий в образцах, что соответствовало значению $6.9 \pm 3.1\%$. При этом детергенты Triton X-100 и Pluronic P123 не обеспечили выделение ДНК бактерий из образцов.

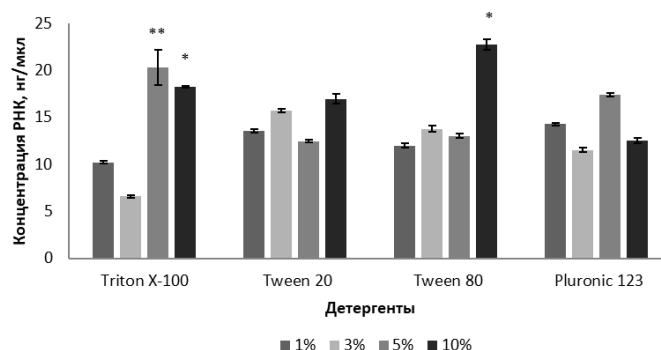


Рис. 5. Гистограмма зависимости концентраций экстрагированной РНК от концентрации детергентов. ** - различия в концентрации ДНК относительно 1% и 3% концентрации того же детергента статистически достоверны; * - различия в концентрации ДНК относительно 1% концентрации того же детергента статистически достоверны
 Fig. 5. Histogram of the dependence of the concentrations of extracted RNA on the concentration of detergents. ** - differences in DNA concentration relative to 1% and 3% concentration of the same detergent are statistically significant; * - differences in DNA concentration relative to 1% concentration of the same detergent are statistically reliable

Таблица 1. Относительное содержание бактерий *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila* в образцах, %

Table 1. Relative content of *Faecalibacterium prausnitzii* and *Akkermansia muciniphila* bacteria in samples, %

Детергент	Концентрация	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , %	<i>Akkermansia muciniphila</i> , %
Triton X-100	1%	0.08±0.01	-
	5%	0.010±0.002	-
Tween 20	1%	0.10± 0.01	6.9±3.1
	5%	0.06±0.02	1.0±0.9
Tween 80	1%	0.030±0.003	0.6± 0.2
	5%	0.030±0.003	5.1±2.3
Pluronic P123	1%	0.030±0.002	-
	5%	0.07±0.02	-

Заключение

В ходе оценки эффективности выделительных систем на основе сорбции с включением в состав лизирующего раствора детергентов Triton X-100, Tween 20, Tween 80 и Pluronic P123 в концентрациях 1, 3, 5 и 10% было установлено, что Tween 80 в концентрациях 1 и 3% в составе лизирующего раствора позволяет эффективнее остальных детергентов экстрагировать ДНК. При этом с увеличением концентрации детергентов на электрофореграмме наблюдался характерный рисунок РНК совместно с ДНК. Максимальные значения концентрации выделенной ДНК характерны при добавлении

детергента Tween 20. Это согласуется с результатами, полученными на основе Real-Time PCR. Высокие показатели относительного содержания бактерий *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila* были получены при использовании Tween 20. Набор для выделения нуклеиновых кислот на основе сорбции помимо ДНК эффективно экстрагирует и РНК. Самые большие значения концентрации РНК были характерны для 10% Tween 80 и 5% Triton X-100. При этом с увеличением концентрации детергента зафиксирован лучший выход РНК, что подтверждается результатами электрофореза. Примечательно, что отсутствие де-



тергентов в лизирующем растворе в целом обеспечивает выделение ДНК из фекалий, но при этом не позволяет изолировать РНК.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет из-

Список литературы/References

1. Gryaznova M.V., Burakova I.Yu., Smirnova Yu.D., Syromyatnikov M.Yu., Popov V.N. A study of the gut microbiome in people with irritable bowel syndrome. *Current biotechnology*. 2022; 1: 78-79.
2. Maghini D.G., Moss E.L., Vance S.E., Bhatt A.S. Improved high-molecular-weight DNA extraction, nanopore sequencing and metagenomic assembly from the human gut microbiome. *Nature Protocols*. 2021; 16(1): 458-471.
3. Husakova M., Kralik P., Babak V., Slana I. Efficiency of DNA isolation methods based on silica columns and magnetic separation tested for the detection of mycobacterium avium Subsp. Paratuberculosis in milk and faeces. *Materials (Basel)*. 2020; 13(22): 5112.
4. Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*. 2011; 50: 325-328.
5. Barazesh A., Sarkari B., Ebrahimi S., Hami M. DNA extraction from hydatid cyst protoscolices: Comparison of five different methods. *Veterinary World*. 2018; 11: 231-234.
6. Chen F., Ye J., Chio C., Liu W., Shi J., Qin W. A simplified quick microbial genomic DNA extraction via freeze-thawing cycles. *Molecular Biology Reports*. 2020; 47: 703-709.
7. Teyssier N.B., Chen A., Duarte E.M., Sit R., Greenhouse B., Tessema S.K. Optimization of whole-genome sequencing of Plasmodium falciparum from low-density dried blood spot samples. *Malaria Journal*. 2021; 20: 116.
8. Wang T.Y., Wang L., Zhang J.H., Dong W.H. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR.

вестных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Genetics and Molecular Research. 2011; 10(1): 519-25.

9. Cady N.C., Stelick S., Batt C.A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors & Bioelectronics*. 2003; 19: 59-66.

10. Rimola A., Costa D., Sodupe M., J-F. Lambert, Ugliengo P. Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. *Chemical Reviews*. 2013; 113: 4216-4313.

11. Zhang Y., Cremer P.S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006; 10: 658-663.

12. Poeckh T., Lopez S., Fuller A.O., Solomon M.J., Larson R.G. Adsorption and elution characteristics of nucleic acids on silica surfaces and their use in designing a miniaturized purification unit. *Analytical Biochemistry*. 2008; 373: 253-262.

13. Kaźmierczak-Siedlecka K., Skonieczna-Żydecka K., Hupp T., Duchnowska R., Marek-Trzonkowska N., Połom K. Next-generation probiotics - do they open new therapeutic strategies for cancer patients? *Gut Microbes*. 2022; 14(1): 2035659.

14. Chang C.J., Lin T.L., Tsai Y.L., Wu T.R., Lai W.F., Lu C.C., Lai H.C. Next generation probiotics in disease amelioration. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019; 27(3): 615-622.

15. Vallianou N.G., Kounatidis D., Tsilingiris D., Panagopoulos F., Christodoulatos G.S., Evangelopoulos A., Karampela I., Dalamaga M. The role of next-generation probiotics in obesity and obesity-associated disorders: current knowledge and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(7): 6755.



16. Delgado S., Sánchez B., Margolles A., Ruas-Madiedo P., Ruiz L. Molecules produced by probiotics and intestinal microorganisms with immunomodulatory activity. *Nutrients*. 2020; 12(2): 391.

17. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28(3): 495-503.

18. Nesterova E.Y., Dvoretzkaya Y.D., Gryaznova M.V., Gladkih M.I., Syromyatnikov M.Y., Starkova N.N., Popov V.N. Analysis of methods for PCR products concentrating for subsequent sequencing using methods based on the sorption of nucleic acids. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie*

Protsessy, 2020; 20(6): 782-788. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/3146> (In Russ.)

19. Gryaznova M.V., Dvoretzkaya Yu.D., Syromyatnikov M.Yu., Mikhailov E.V., Popov V.N. Animal hygiene, disinfection, disinfestation and deratization products. *Veterinary pharmacological bulletin*. 2022; 1(18): 69-78.

20. Yang Y.W., Chen M.K., Yang B.Y., Huang X.J., Zhang X.R., He L.Q., Zhang J., Hua Z.C. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for Real-Time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015; 81(19): 6749-56.

Информация об авторах / Information about the authors

Е.Ю. Нестерова – младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, ВГУИТ, Воронеж. Аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж, Россия

М.И. Гладких – младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, ВГУИТ, Воронеж, Россия

А.С. Завалюева – младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий ВГУИТ, Воронеж. Аспирант кафедры аналитической химии ВГУ, Воронеж, Россия

М.Ю. Сыромятников – ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж. Доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж, Россия

E.Yu. Nesterova – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, VSUIT, Voronezh. Post-graduate student of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Russian Federation, e-mail: katya.nesterova.1997@mail.ru

M.I. Gladkikh – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, VSUIT, Voronezh, Russian Federation, e-mail: mariya221095@yandex.ru

A.S. Zavalyueva – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, VSUIT, Voronezh. Post-graduate student of the Department of Analytical Chemistry, Russian Federation,

M.Yu. Syromyatnikov – Leading Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh. Associate Professor of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: mihan.vrn@mail.ru

Статья поступила в редакцию 25.06.2024; одобрена после рецензирования 28.08.2024; принята к публикации 04.09.2024.

The article was submitted 25.06.2024; approved after reviewing 28.08.2024; accepted for publication 04.09.2024.