



Влияние малых молекул растительного происхождения на микробное разнообразие слепого отдела кишечника цыплят-бройлеров

Галимжан Калиханович Дускаев, Людмила Викторовна Власенко, Дианна Багдасаровна Косян, Марина Яковлевна Курилкина

Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук (ФНЦ БСТ РАН), г. Оренбург

Аннотация: В настоящее время в птицеводстве существует большой спрос на разработку экологически безопасных (в отличие от антибиотиков) добавок, способных оказывать положительное влияние на микробиом кишечника цыплят-бройлеров и контролировать патогенную микрофлору. Перспективным объектом могут выступать соединения растительного происхождения. Цель работы – исследовать влияние подобных соединений на микробное разнообразие слепого отдела кишечника цыплят-бройлеров кросса Arbor Acres. Для этого было сформировано 5 групп 7-дневных цыплят: контрольная (получала основной пшенично-соевый рацион без добавок) и 4 опытные, в рационы дополнительно включали 4-гексилрезорцин и его сочетания с α -октанолактоном и 7,8-дигидрокси-4-метилкумарином. Таксономический анализ микробиома слепых отростков кишечника 42-дневных цыплят выполнен на основе секвенирования последовательности гена 16S рРНК. Установлено, что добавление исследуемых соединений в рацион оказывает влияние на микробиом слепого отдела кишечника бройлеров. Наиболее значимые изменения касаются филума Firmicutes, в частности, класса Clostridia, количество представителей которого уменьшается во всех опытных группах, и класса Bacilli, количество представителей которого значительно увеличивается за счет увеличения количества бактерий семейства Lactobacillaceae (роды Limosilactobacillus и Lactobacillus). Полученные результаты можно использовать для составления рационов для бройлеров, способствующих оптимизации микрофлоры слепого отдела кишечника.

Ключевые слова: цыплята-бройлеры, малые молекулы растительного происхождения, микробиом слепых отростков кишечника.

Для цитирования: Дускаев, Г.К. Влияние малых молекул растительного происхождения на микробное разнообразие слепого отдела кишечника цыплят-бройлеров / Г.К. Дускаев, Л.В. Власенко, Д.Б. Косян, М.Я. Курилкина // Птицеводство. – 2023. – №4. – С. 46-51.

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-4-46-51

Введение. Интенсивное развитие птицеводческой отрасли во многом зависит от добавления в комбикорма различных биоактивных веществ, в том числе антибиотиков, оказывающих влияние на здоровье и продуктивность птицы [1]. Постоянное использование антибиотиков для подобных целей привело к росту числа возбудителей болезней, устойчивых к некоторым современным антибактериальным препаратам [2].

После подписания закона о запрете использования антибиоти-

ков в качестве стимуляторов роста в птицеводстве и животноводстве во всем мире активно ведется поиск аналогов кормовых антибиотиков [3], обладающих антибактериальным действием, но являющихся безопасными. Особое место при этом занимают синтетические аналоги природных растительных компонентов (малые молекулы растительного происхождения), которые оказывают влияние на продуктивность и здоровье птицы, в т.ч. за счет изменения состава и функций

микробиома кишечника [4,5]. Результаты недавних исследований свидетельствуют также о способности соединений растительного происхождения усиливать ингибирование активности системы чувства кворума (quorum sensing, QS) бактерий путем инактивации регуляторных молекул [6], что может быть полезным для лечения инфекций, особенно вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов [7]. В связи с этим их использование в рационах цыплят-бройлеров представляет



Таблица 1. Схема экспериментального исследования

Группа	Количество голов в группе	Рацион
Контрольная	25	ОР
I опытная		ОР + 4-гексилрезорцин (0,5 мг/кг живой массы (ЖМ) в сутки)
II опытная		ОР + 4-гексилрезорцин (0,4 мг/кг ЖМ/сут.) и γ -октанолактон (0,1 мг/кг ЖМ/сут.)
III опытная		ОР + 4-гексилрезорцин (0,1 мг/кг ЖМ/сут.) и 7,8-дигидрокси-4-метилкумарин (0,15 мг/кг ЖМ/сут.)
IV опытная		ОР + 4-гексилрезорцин (0,05 мг/кг ЖМ/сут.), γ -октанолактон (0,15 мг/кг ЖМ/сут.) и 7,8-дигидрокси-4-метилкумарин (0,01 мг/кг ЖМ/сут.)

большой научный интерес. Так, имеются данные о возможном применении 4-гексилрезорцина для повышения эффективности некоторых антибиотиков, а исследования о наличии/отсутствии у 4-гексилрезорцина анти-QS эффекта относительно немногочисленны. В недавних работах установлено, что γ -октанолактон положительно влияет на продуктивные качества цыплят-бройлеров, а также оказывает выраженное ингибирующее действие на LuxI/LuxR-системы QS [4]. Также установлено, что 7,8-дигидрокси-4-метилкумарин проявляет антибактериальный и анти-QS эффекты [8], а в сочетании с другими соединениями (4-гексил-1,3-бензолдиолом и γ -октанолактоном) оказывает синергетический анти-QS эффект [8].

Целью работы стало исследование влияния малых молекул растительного происхождения на микробное разнообразие слепого отдела кишечника цыплят-бройлеров.

Материал и методика исследования. Объектом исследования служили цыплята-бройлеры кросса Арбор Айкрес. Работа была выполнена в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (ГОСТ Р 53434-2009). Все процедуры над животными были выполнены в соответствии с правилами Комитета по этике животных ФНЦ БСТ РАН. При проведении исследований

были предприняты меры, сводящие страдания животных к минимуму.

Эксперимент проведен на базе вивария ФНЦ БСТ РАН на 125 головах 7-дневных бройлеров, разделенных на 5 групп: контрольная и 4 опытные. Период эксперимента – 42 дня. Кормление и поение птицы осуществлялось групповым методом согласно рекомендациям ВНИТИП.

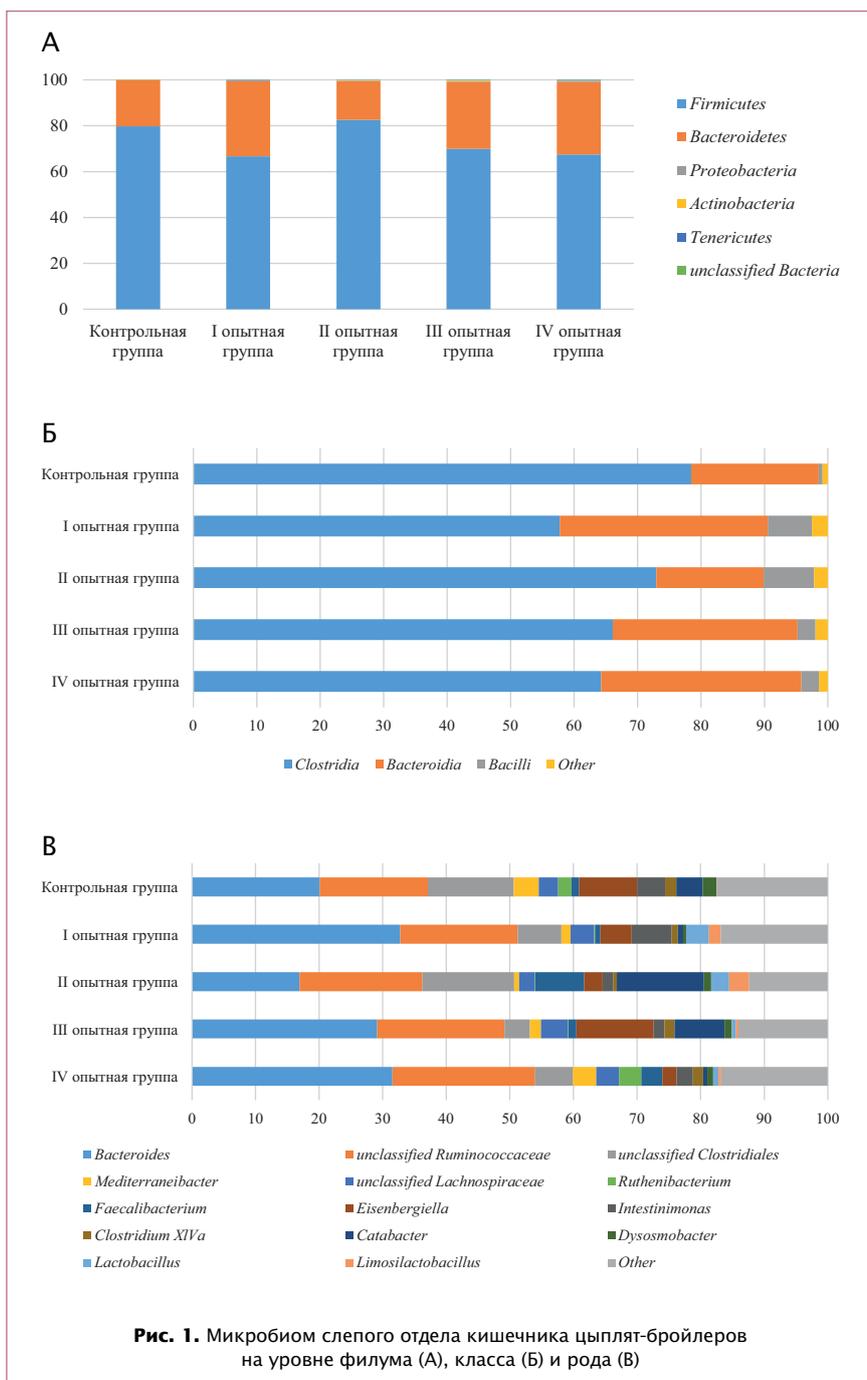
Контрольная группа получала основной рацион (ОР) без добавок. Состав ОР (%): пшеница – 48,0; ячмень – 2,7; кукуруза – 7,6; соевый шрот (46% СП) – 25,5; подсолнечный шрот (38% СП) – 7,4; подсолнечное масло – 5,1; дикальцийфосфат – 1,7; мел кормовой – 1,0; известняк – 0,6; соль – 0,4; DL-метионин – 0,19; L-лизин – 0,36; бикарбонат натрия – 0,12; витаминно-минеральный премикс – 2,1.

В рационы опытных групп дополнительно включались малые молекулы растительного происхождения с доказанной QS-ингибирующей активностью (табл. 1): 4-гексилрезорцин (AL209465; Sigma-Aldrich, США); γ -октанолактон (ALO4008; Sigma-Aldrich, США); 7,8-дигидрокси-4-метилкумарин (AL630748; Sigma-Aldrich, США).

Декапитация птицы проводилась под нембуталовым эфиром на 42-е сутки жизни. Отбор проб содержимого слепого отдела кишечника проводили после убоя птицы в пробирки типа эппендорф (Eppendorf, Германия). Тотальную

ДНК из образцов выделяли при помощи набора Fast DNA® SPIN Kit for Faeces (MP Biomedicals Inc., США) с использованием лизирующего матрикса Lysing Matrix E. Образцы гомогенизировали на приборе Tissue Lyser LT (Qiagen, Нидерланды). Приготовление ДНК-библиотек выполнено в соответствии с протоколом Illumina (Part #15044223, Rev. B.). Секвенирование ампликоновых ДНК-библиотек проведено на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit v.2 (500-cycle) (Illumina, США). Приготовление ДНК-библиотек, секвенирование и биоинформатическая обработка были выполнены в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург, Россия).

Результаты исследований и их обсуждение. При изучении микробного разнообразия образцов содержимого слепого отдела кишечника бройлеров **контрольной группы** было выявлено 279 операционных таксообразующих единиц (ОТЕ), которые были отнесены к 4 филумам (рис. 1А). Наиболее выраженными в количественном отношении от общего числа классифицированных бактерий являлись филумы *Firmicutes* (79,75%) и *Bacteroidetes* (20,08%), что согласуется с проведенными ранее исследованиями [9]. Филумы *Proteobacteria* и *Actinobacteria* составили менее 1% от общего



многочисленным семейством класса *Clostridia* было семейство *Lachnospiraceae* (20,55%), представленное преимущественно родами *Eisenbergiella* (9,15%), *Mediterraneibacter* (3,93%), *Clostridium XIVa* (1,79%), а также не идентифицированными представителями (*unclassified Lachnospiraceae* – 3,06%) (рис. 1В). Бактерии семейства *Lachnospiraceae* участвуют в разложении растительных веществ, а также производстве бактериоцинов, бутирата и лактата. Семейство *Catabacteriaceae* (4,16%) включало представителей рода *Catabacter* (4,16%). Также в классе *Clostridia* присутствовала группа не классифицированных бактерий (*unclassified Clostridiales*) – 13,52%. В филуме *Firmicutes* также были идентифицированы бактерии класса *Bacilli* (0,59%), содержание которых несколько увеличивалось в опытных группах при добавлении к ОР тестируемых веществ.

Филум *Bacteroidetes* (20,08%) был представлен единственным классом *Bacteroidia* (20,08%) с семейством *Bacteroidaceae* и родом *Bacteroides*. При этом для некоторых опытных групп (I, III и IV) зафиксировано увеличение численности бактерий данного филума (рис. 1А), представители которого участвуют в гидролизе сложных молекул до более простых, и их преобладание способствует улучшению показателей роста птицы. Бактерии остальных родов филума по количеству не превышали 1% каждый.

Микробный профиль цыплят-бройлеров **I опытной группы** был представлен микроорганизмами, относящимся к 4 филумам, идентифицировано 250 ОТЕ (рис. 1А). При этом наблюдалось увеличение бактерий филума *Bacteroidetes* на 12,67% от контро-

количества выделенных бактерий. Другие группы бактерий, не идентифицированные в ходе исследования (*unclassified Bacteria*), составили не более 0,09%.

Преобладающее количество выделенных бактерий филума *Firmicutes* относилось к классу *Clostridia* (78,47%) (рис. 1Б), в котором наиболее многочисленным семейством было *Ruminococcaceae* (32,33%), представители

которого являются нормальной микрофлорой кишечника птиц и участвуют в расщеплении веществ, содержащихся в составе компонентов ОР. Семейство *Ruminococcaceae* включало роды *Intestinimonas* (4,36%), *Dysosmobacter* (2,15%) и *Ruthenibacterium* (2,06%), *Faecalibacterium* (1,20%), а также не классифицированных представителей (*unclassified Ruminococcaceae*) – 17,02%. Менее



ля (до 32,75%) и снижение числа бактерий, относящихся к филуму *Firmicutes*, на 13,16% (до 66,59%), что также выражалось в изменении доли в микробиоценозе представителей выделенных классов, семейств и родов бактерий. Филумы *Proteobacteria*, *Tenericutes* и группа не идентифицированных бактерий (*unclassified Bacteria*) составили менее 1% от общего количества.

Наблюдалось уменьшение представителей класса *Clostridia* на 20,72% (до 57,75%) (рис. 1Б), представленного семейством *Ruminococcaceae* (29,95%), максимальный процент которого составила не классифицированная группа – *unclassified Ruminococcaceae* (18,47%) и род *Intestinimonas* (6,28%) (рис. 1В). Подобные результаты ранее были зафиксированы при введении в рацион птицы таннинсодержащих ингредиентов, которые препятствовали развитию микроорганизмов класса *Clostridia* [9]. Содержание бактерий другого семейства – *Lachnospiraceae* (19,03%) – было примерно таким же, как в контрольной группе, при этом наблюдались незначительные изменения представителей ряда родов (рис. 1В). Также отмечалось снижение количества бактерий семейства *Catabacteriaceae* (до 0,85%), представленное родом *Catabacter* (0,85%). Отмечалось значительное увеличение (в 11,81 раз по сравнению с контрольной группой) бактерий класса *Bacilli* (6,97%), включавшего семейство *Lactobacillaceae* (5,82%), облигатные представители которого, благодаря синтезу органических кислот и бактериоцинов, способны к конкурентному вытеснению патогенов [10].

Во **II опытной группе** было идентифицировано 271 ОТЕ, которые принадлежали к 5 филумам (рис. 1А). При этом было зафиксиро-

вано незначительное изменение по сравнению с контролем числа бактерий, относящихся к филумам *Firmicutes* (82,54%) и *Bacteroidetes* (16,93%), а доля *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria* и *unclassified Bacteria* составила не более 1% от общего количества.

На более низком таксономическом уровне выявлено доминирующее положение класса *Clostridia* (72,93%), численность которого уменьшилась на 5,54% по сравнению с контрольной группой (рис. 1Б). При этом более многочисленным семейством было *Ruminococcaceae* (35,04%), для которого зафиксировано снижение представителей родов *Intestinimonas* (1,70%), *Dysosmobacter* (1,17%), *Ruthenibacterium* (0,07%) и увеличение в 6,37 раз бактерий рода *Faecalibacterium* (7,64%), а не классифицированная группа (*unclassified Ruminococcaceae*) составила 19,32% (рис. 1В). Содержание бактерий семейства *Lachnospiraceae* значительно снижалось (8,93%) по сравнению с контрольной группой, что выражалось в изменении представителей родов *Eisenbergiella* (2,94%), *Mediterraneibacter* (0,76%), *Clostridium XIVa* (0,53%) и *unclassified Lachnospiraceae* (2,50%). Также отмечалось увеличение представителей семейства *Catabacteriaceae* (13,67%) с доминирующим родом *Catabacter* (13,67%). В филуме *Firmicutes* значительные изменения коснулись класса *Bacilli*, количество представителей которого (7,95%) увеличилось в 13,47 раз по сравнению с контролем и включало семейство *Lactobacillaceae* (7,71%), роды *Limosilactobacillus* (3,16%) и *Lactobacillus* (2,82%) (рис. 1В).

В ходе секвенирования образцов содержимого слепого отдела кишечника **III опытной группы** идентифицировано 255 ОТЕ, кото-

рые отнесены к 5 филумам (рис. 1А). При этом наблюдалось снижение относительно контроля числа представителей филума *Firmicutes* (до 69,92%) и увеличение – *Bacteroidetes* (до 29,12%), что коррелирует с результатами исследования [5], в котором было изучено действие кумарина на микробиом цыплят при его добавлении в рацион. Филумы *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Tenericutes* и *unclassified Bacteria* составили около 1% от общего количества идентифицированных бактерий.

Для данной группы отмечалось уменьшение представителей класса *Clostridia* (до 66,09%) (рис. 1Б), представленного в наибольшей степени семейством *Ruminococcaceae* (30,26%), максимальный процент которого составила не классифицированная группа – *unclassified Ruminococcaceae* (20,03%) (рис. 1В). Содержание бактерий другого семейства – *Lachnospiraceae* (22,38%) – было примерно таким же, как в контрольной группе, с незначительными изменениями на уровне рода (рис. 1В). Также отмечалось увеличение представителей семейства *Catabacteriaceae* (до 7,86%), представленного родом *Catabacter* (7,86%). Тенденция к увеличению численности представителей класса *Bacilli* (2,84%) с семейством *Lactobacillaceae* (2,03%) сохранялась и для данной опытной группы, его содержание превосходило контрольную группу в 4,81 раза.

В **IV опытной группе** было идентифицировано 287 ОТЕ, которые принадлежали к 5 филумам (рис. 1А). Введение в рацион цыплят-бройлеров смеси всех исследуемых веществ привело к незначительным изменениям по сравнению с контролем количества представителей 2 филумов – *Firmicutes* (67,50%) и *Bacteroidetes* (31,53%). Доля остальных



филумов – *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria* и *unclassified Bacteria* – составила не более 1% от общего количества.

Лидирующее положение в филуме *Firmicutes* также принадлежало классу *Clostridia* (64,27%), численность которого уменьшилась на 14,20% по сравнению с контрольной группой (рис. 1Б). При этом более многочисленным семейством было *Ruminococcaceae* (40,64%), для которого зафиксировано некоторые изменения на уровне рода (рис. 1В). Содержание бактерий семейства *Lachnospiraceae* незначительно снижалось (16,05%) по сравнению с контрольной группой; также отмечалось снижение представи-

телей семейства *Catabacteriaceae* (0,66%) с доминирующим родом *Catabacter* (0,66%). В филуме *Firmicutes* незначительные изменения коснулись класса *Bacilli*, количество представителей которого (2,80%) увеличилось в 4,74 раза по сравнению с контролем и было представлено, в основном, семейством *Lactobacillaceae* (2,18%).

Заключение. Доминирующими в количественном отношении от общего числа классифицированных бактерий в контрольной и опытных группах являлись филумы *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Включение в рацион цыплят-бройлеров малых молекул растительного происхождения в большинстве случаев ведет к увели-

чению числа представителей филума *Bacteroidetes* и снижению – *Firmicutes*, что также выражается в изменении доли выделенных классов, семейств и родов бактерий. При этом в опытных группах значительно повышается количество бактерий класса *Bacilli* (семейство *Lactobacillaceae*) на фоне снижения бактерий класса *Clostridia*. Полученные результаты обеспечивают теоретическую основу для составления рационов, способствующих благотворной микробной колонизации слепого отдела кишечника цыплят-бройлеров.

Исследование выполнено по теме НИР № FNWZ 2022-0010.

Литература / References

1. Mehdi, Y. Use of antibiotics in broiler production: global impacts and alternatives / Y. Mehdi, M.-P. Létourneau-Montminy, M.-L. Gaucher, Y. Chorfi, G. Suresh, T. Rouissi, S.K. Brar, C. Côté, A.A. Ramirez, S. Godbout / Anim. Nutr. - 2018. - V. 4. - No 2. - P. 170-178. doi: 10.1016/j.aninu.2018.03.002
2. Abd El-Hack, M.E. Alternatives to antibiotics for organic poultry production: types, modes of action and impacts on bird's health and production / M.E. Abd El-Hack, M.T. El-Saadony, H.M. Salem, A.M. El-Tahan, M.M. Soliman, G.B.A. Youssef, A.E. Taha, S.M. Soliman, A.F. El-Kott, K.M. Al Syaad, A.A. Swelum / Poult. Sci. - 2022. - V. 101. - No 4. - P. 101696. doi: 10.1016/j.psj.2022.101696.
3. Gadde, U. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review / U. Gadde, W.H. Kim, S.T. Oh, H.S. Lillehoj / Anim. Health Res. Rev. - 2017. - V. 18. - No 1. - P. 26-45. doi: 10.1017/S1466252316000207
4. Duskaev, G.K. *Eucalyptus viminalis* leaf extract alters the productivity and blood parameters of healthy broiler chickens / G.K. Duskaev, O.V. Kvan, Sh.G. Rakhmatullin / Vet. World. - 2020. - V. 13. - No 12. - P. 2673-2680. doi: 10.14202/vetworld.2020.2673-2680
5. Duskaev, G. Coumarin derivative and *Bacillus cereus* change live weight and cecal ecology in broilers / G. Duskaev, O. Kvan, D. Kosyan, S. Rakhmatullin, G. Levakhin // AIMS Agric. Food. - 2021. - V. 6. - No 1. - P. 360-380. doi: 10.3934/agrfood.2021022
6. Deryabin, D.G. Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (oak bark) extract / D.G. Deryabin, A.A. Tolmacheva // Molecules. - 2015. - V. 20. - No 9. - P. 17093-17108. doi: 10.3390/molecules200917093
7. Reen, F.J. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition / F.J. Reen, J.A. Gutiérrez-Barranquero, M.L. Parages, F.O. Gara // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2018. - V. 102. - No 5. - P. 2063-2073. doi: 10.1007/s00253-018-8787-x
8. Deryabin, D. Coumarin's anti-quorum sensing activity can be enhanced when combined with other plant-derived small molecules / D. Deryabin, K. Inchagova, E. Rusakova, G. Duskaev // Molecules. - 2021. - V. 26. - No 1. - P. 208. doi: 10.3390/molecules26010208
9. Xiao, Y. Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken / Y. Xiao, Y. Xiang, W. Zhou, J. Chen, K. Li, H. Yang // Poult. Sci. - 2017. - V. 96. - No 5. - P. 1387-1393. doi: 10.3382/ps/pew372
10. Yin, D. Supplemental thymol and carvacrol increases ileum *Lactobacillus* population and reduces effect of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in chickens / D. Yin, E. Du, J. Yuan, J. Gao, Y. Wang, S.E. Aggrey, Y. Guo // Sci. Rep. - 2017. - V. 7. - P. 7334. doi: 10.1038/s41598-017-07420-4

Сведения об авторах:

Дускаев Г.К.: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. С.Г. Леушина; gduskaev@mail.ru. **Власенко Л.В.:** кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории селекционно-генетических исследований в животноводстве; lv.efremova@yandex.ru. **Косян Д.Б.:** кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории селекционно-генетических исследований в животноводстве; kosyan.diana@mail.ru. **Курилкина М.Я.:** кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Испытательного центра ЦКП; icvniims@mail.ru.

Статья поступила в редакцию 01.02.2023; одобрена после рецензирования 12.03.2023; принята к публикации 20.03.2023.

Research article

The Effect of Small Molecules of Plant Origin on the Cecal Microbial Diversity in Broilers

Galimzhan K. Duskaev, Liudmila V. Vlasenko, Dianna B. Kosyan, Marina Ya. Kurilkina

Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Orenburg

Abstract. *Currently there is a great demand in the poultry industry for the development of environmentally friendly (as opposed to antibiotics) additives which can positively affect the intestinal microbiome of broiler chickens and control pathogenic microflora. Certain plant-derived compounds can be a promising alternative to in-feed antibiotics. The purpose of the study was to investigate the effect of several plant-derived compounds on the cecal microbial diversity in broiler chicks (cross Arbor Acres, 5 treatments, 25 birds per treatment, 7-42 days of age). Control treatment was fed wheat-soy diet without additives; similar diets for four other treatments were additionally supplemented with 4-hexylresorcinol and its combinations with γ -octanolactone and 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin. Taxonomic analysis of the cecal microbiota was performed based on sequencing of the 16S rRNA gene. It was found that all combinations of dietary bioactive compounds affected the cecal microbiota. The most significant changes were found in the concentrations of the species of phylum Firmicutes, in particular class Clostridia, which were decreased in all four treatments fed the additives, and class Bacilli, which were significantly increased, predominantly due to the increase in the concentration of family Lactobacillaceae (including geni Limosilactobacillus and Lactobacillus). The results of the trial can be used in the formulation of diets for broilers which can optimize the composition of cecal microbiota.*

Keywords: broiler chicks, small molecules of plant origin, cecal microbiome.

For Citation: Duskaev G.K., Vlasenko L.V., Kosyan D.B., Kurilkina M.Ya. (2023) The effect of small molecules of plant origin on the cecal microbial diversity in broilers. *Ptitsevodstvo*, 72(4): 46-51. (in Russ.)

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-4-46-51

(For references see above)

Authors:

Duskaev G.K.: Dr. of Biol. Sci., Lead Research Officer, Dept. of Animal Nutrition and Feed Production named after S.G. Leushin; gduskaev@mail.ru. **Vlasenko L.V.:** Cand. of Biol. Sci., Research Officer, Lab. of Animal Genetics and Breeding; lv.efremova@yandex.ru. **Kosyan D.B.:** Cand. of Biol. Sci., Senior Research Officer, Lab. of Animal Genetics and Breeding; kosyan.diana@mail.ru. **Kurilkina M.Ya.:** Cand. of Biol. Sci., Senior Research Officer, Dept. of Analysis; icvniims@mail.ru.

Submitted 01.02.2023; revised 12.03.2023; accepted 20.03.2023.