



УДК 616-008.87-07.097.931

## Использование молекулярно-генетических методов для типирования бифидобактерий и анализ видовой архитектуры кишечного микробиоценоза у жителей промышленного города

Ю. П. Джиоев<sup>1</sup>, Е. Г. Ламсков<sup>1</sup>, С. М. Попкова<sup>1</sup>, А. Г. Леонтьева<sup>1</sup>, Е. Б. Ракова<sup>1</sup>,  
Л. В. Миронова<sup>1</sup>, Г. В. Юринова<sup>2</sup>, В. П. Саловарова<sup>2</sup>, А. В. Ляпунов<sup>1</sup>,  
А. А. Приставка<sup>2</sup>, П. А. Медведева<sup>2</sup>, А. И. Пилуева<sup>2</sup>, А. С. Волокитина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗС РЧ СО РАМН, Иркутск

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: alanir07@mail.ru

**Аннотация.** Впервые в региональной медицинской клинической практике для диагностики рода и видов бифидобактерий использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Предлагаемый подход адаптирован и оптимизирован по условиям диагностических стандартов для разработки метода идентификации и типирования видов бифидобактерий в мультиплексном варианте. Полученные результаты видового типирования бифидобактерий в популяции населения промышленного города (г. Ангарск) в некоторой степени отражают сложность механизмов воздействия внешних и внутренних факторов на процессы формирования кишечного микробиоценоза, проявляющуюся в структурном разнообразии видовой архитектуры бифидобактерий в организме человека.

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, бифидобактерии, родовая и видовая идентификация, типирование, дисбактериоз, видовая архитектура.

### Введение

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) стал рутинным методом в биологической и медицинской практике [4; 5]. Однако во многих клинических лабораториях для идентификации и типирования бактерий кишечной микрофлоры в большей мере используют традиционные культуральные методы, определяющие в основном фенотипические и биохимические характеристики бактерий [2; 3]. Молекулярно-генетические технологии (молекулярная гибридизация, ПЦР, сиквенс) являются наиболее чувствительными и специфичными для детекции и идентификации широкого спектра микроорганизмов [1; 6; 10–15]. Поэтому внедрение в диагностическую практику этих технологий актуально и востребовано как в научной, так и прикладной биомедицине [9].

Микроорганизмы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) выполняют важнейшую работу в организме человека и животных, обеспечивая процессы переваривания и всасывания, трофику кишечника, антиинфекционную защиту, синтез витаминов и т. д. Среди них наиболее изученными являются микроорганизмы кишечной микрофлоры, где преобладают бакте-

рии рода *Bifidobacterium*. Бифидобактерии – грамположительные, анаэробные, неспорообразующие бактерии. Нарушение видового баланса бифидобактерий в ЖКТ приводит к дисбиотическим состояниям, которые при отсутствии лечения и коррекции могут стать источником заболеваний инфекционной и неинфекционной природы [7; 8]. Поэтому очень важным остается изучение особенностей видовой архитектуры бифидобактерий в ЖКТ человека в норме и при дисбиозах [9]. Исходя из этого, основной целью данной работы являлась оптимизация и адаптация метода ПЦР для типирования бифидобактерий до уровня рода и видов и анализ особенностей видовой архитектуры бифидобактерий в кишечном микробиоценозе у жителей промышленного города.

### Материалы и методы

Использовали копрологические пробы 67 человек (г. Иркутск-56, г. Ангарск-11) с клиническими проявлениями кишечного дисбактериоза, проходящих обследование в Центре дисбактериозов НЦ ПЗС РЧ СО РАМН. Биомасса бактерий была выращена на стандартной тиогликолевой культуральной среде. В выбор-

ке представлены образцы от взрослых (мужчины, женщины) и детей. Материал был собран за период с 2006 по 2008 гг.

Суммарную бактериальную ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов «РИБО-Преп» фирмы AmpliSens, ПЦР-амплификацию осуществляли с помощью коммерческого набора AmpliSens-200-1. В качестве мишеней для генотипирования был выбран информационный ген 16S рРНК бифидобактерий. Последовательности родо- и видоспецифичных праймеров к гену 16S рРНК представлены в таблице 1 [11; 14]. ПЦР-амплификацию проводили по следующей схеме: первичная денатурация ДНК – 95 °С – 3 мин, далее 30 циклов амплификации при условиях: 94 °С – 30 с, 56 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин, заключительная элонгация – 72 °С – 7 мин. Электрофорез ПЦР-фрагментов ДНК бифидобактерий проводили с использованием 0,8 % агарозного геля в трис-ацетатном буфере. Размеры амплифицированных фрагментов идентифицировали в соответствии с маркером молекулярного веса (Fermentas).

#### Результаты и обсуждение

На этапе подготовки образцов для выделения бактериального ДНК была модифицирована методика, включающая концентрирование осаждением бактериальной биомассы из культуральной среды, последующее ее суспендирование в буфере ТЭ и хранение при – 20 °С. В таких условиях бактериальная ДНК в течение года и более сохраняла свои качества. Подобраны одинаковые оптимальные условия для режима ПЦР-амплификации с наборами прай-

меров к 4 видам бифидобактерий (табл. 1). Такая технология позволит в перспективе разработать мультиплексный вариант ПЦР-диагностики для видовой идентификации бифидобактерий.

Результаты ПЦР-типирования бифидобактерий с родоспецифичными праймерами, полученные на выборке населения г. Иркутска, представлены на рисунке 1. Результаты свидетельствуют о качественной пригодности этих праймеров для типирования рода *Bifidobacterium* в общей массе микроорганизмов кишечного биоценоза. Как видно из рисунка 1, ДНК бифидобактерий значительно лучше амплифицируются с праймерами g-BifF и g-BifR.

Видовой ПЦР-анализ проводился с образцами от жителей г. Ангарска и в исследуемой выборке были выявлены все 4 анализируемых вида (рис. 2). Результаты идентификации (табл. 2), возможно, отражают сложившуюся структуру видовой архитектуры представителей рода бифидобактерий в микробиоценозах жителей промышленного города (г. Ангарск).

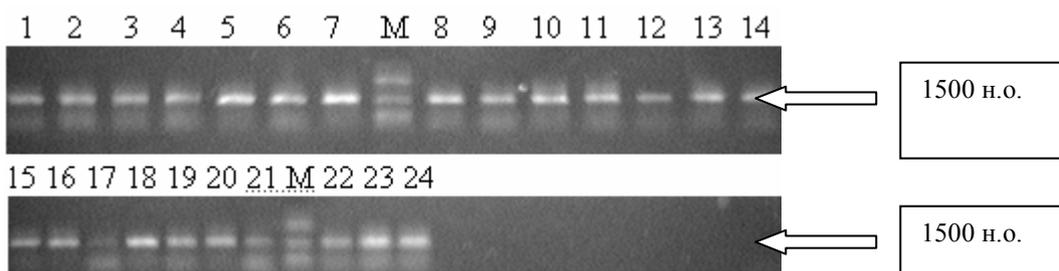
Как видим, для данной выборки доминирующим видом определялся *B. longum*, а субдоминантными – *B. catenulatum* и *B. bifidum*. Архитектоника видов бифидобактерий представлена 7 вариантами структурной сочетаемости: 1) *B. longum*, *B. catenulatum*, *B. bifidum* (3 образца); 2) *B. longum*, *B. bifidum* (1); 3) *B. longum*, *B. catenulatum* (2); 4) *B. longum* (2); 5) *B. catenulatum* (1); 6) *B. bifidum* (10); 7) *B. infantum* (1). В образцах от 5 человек было выявлено только по одному виду из определяемых четырех.

Таблица 1  
Структура и типовое соответствие олигонуклеотидных праймеров, используемых в работе

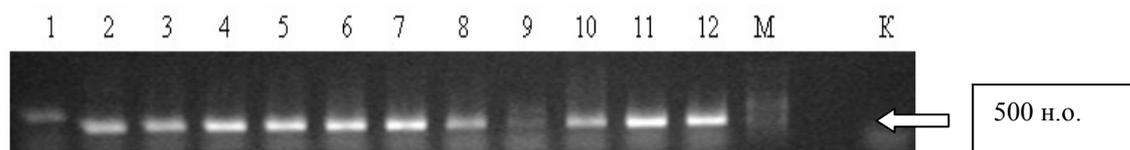
№	Наименование	Последовательности праймеров	Ген	ПЦР-фрагменты (н.о.)	Таксономия бифидобактерий
1	P0-F P6-R	5-GAA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3 5-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3	16S rРНК	1500	<i>Bifidobacterium</i>
2	g-BifF g-BifR	5-CTC CTG GAA FCG GGT GG-3 5-GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A-3	16S rРНК	550	<i>Bifidobacterium</i>
3	BiLON-1F BiLON-2R	5-TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC-3 5-GGG AAG CCG TAT CTC TAC GA-3	16S rДНК	831	<i>B. longum</i>
4	BiBIF-1F BiBIF-2R	5-CCA CAT GAT CGC ATG TGA TTG-3 5-CCG AAG GCT TGCT CCC AAA-3	16S rДНК	278	<i>B. bifidum</i>
5	BiINF-1F BiINF-2R	5-TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC-3 5-GGA AAC CCC ATC TCT GGG AT-3	16S rДНК	828	<i>B. infantum</i>
6	BiCATg-1F BiCATg-2R	5-CGG ATG CTC CGA CTC CT-3 5-CGA AGG CTT GCT CCC GAT-3	16S rДНК	285	<i>B. catenulatum</i>



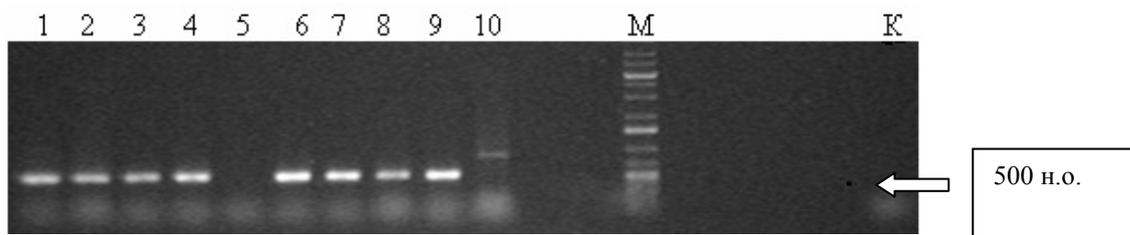
А. 1. Родовые праймеры P<sub>0</sub>-P<sub>6</sub>. Образцы: 1. 343-6; 2. 350-6; 3. 362-6; 4. 360-6; 5. 363-6; 6. 374-6; 7. 450-6; 8. 443-6; 9. 324-6; 21. 328-6, 22. 397-6 хр; 23. Контроль отрицательный; М – маркер молекулярного веса



Б. 1. Родовые праймеры P<sub>0</sub>-P<sub>6</sub>. Образцы: 1. 860-8; 2. 899-6; 3. 852-6; 4. 853-6; 5. Г.С-6; 6. 824-6; 7. 823-6; 8. 833-6; 9. 831-6; 10. 830-6; 11. 829-6; 12. 828-6; 13. 827-6; 14. 826-6; 15. 816-6; 16. 780-8; 17. Б.С-8; 18. Б.В-8; 19. 856-8; 20. 855-8; 21. 861-8; 22. 859-8; 23. 854-8; 24. 853-8; М – маркер молекулярного веса



В. 1. Родовые праймеры gBifF-gBifR. Образцы: 1. 241-8; 2. 226-10; 3. 240-6; 4. 239-6; 5. 225-8; 6. 243-8; 7. 242-8; 8. 224-10; 9. 223-8; 10. 236-6; 11. 237-8; 12. 238-5; М – маркер молекулярного веса; К – отрицательный контроль



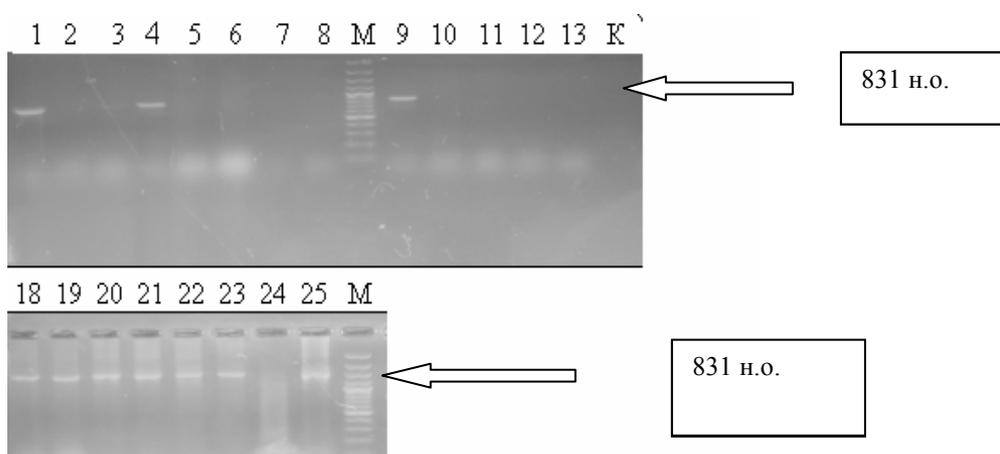
Г. 1. Родовые праймеры gBifF- gBifR. Образцы: 1. 800-6; 2. 797-6; 3. 815-6; 4. 814-6; 6. 810-6; 7. 809-6; 8. 808-6; 9. 807-6; 10. 806-6; М – маркер молекулярного веса; К – отрицательный контроль

Рис. 1. Электрофореграммы результатов ПЦР с родовыми праймерами. Представлены положительные результаты ПЦР-амплификации, соответствующие по размеру фрагментов ДНК маркера

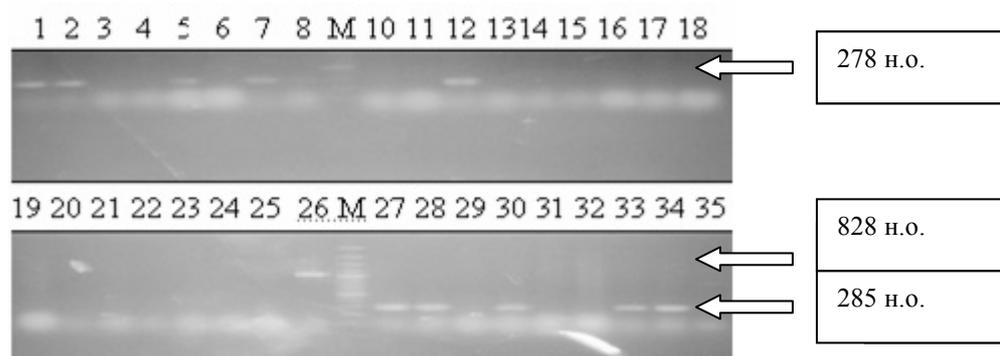
Таблица 2

Результаты видовой идентификации и типирования бифидобактерий

№	Номер образца	Пол	Возраст, год, мес.	<i>B. bifidum</i>	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. infantum</i>
1	14-5	Ж	29	+	-	+	-
2	17-5	Ж	7	+	+	+	-
3	18-5	Ж	23	-	-	+	-
4	20-5	Ж	31	+	+	+	-
5	21-5	Ж	8	-	-	-	+
6	22-5	Ж	35	-	+	-	-
7	23-5	М	32	+	+	+	-
8	24-5	Ж	32	-	+	+	-
9	25-5		1 г. 8 мес.	+	-	-	-
10	26-5	Ж	26	-	-	+	-
11	27-5	М	1 г. 6 мес.	-	+	+	-



А. В лунках с №: 1. 23-5 – *B. longum*; 4. 27-5 – *B. longum*; 9. 24-5 – *B. longum*; 18. 23-5 – *B. longum*; 19. 20-5 – *B. longum*; 20. 26-5 – *B. longum*; 21. 27-5 – *B. longum*; 22. 14-5 – *B. longum*; 23. 18-5 – *B. longum*; 25. 17-5 – *B. longum*. М – маркер молекулярного веса. К – отрицательный контроль



Б. В лунках с №: 1. 23-5 – *B. bifidum*; 2. 20-5 – *B. bifidum*; 5. 14-5 – *B. bifidum*; 7. 17-5 – *B. bifidum*; 12. 25-5 – *B. bifidum*; 26. 21-5 – *B. infantum*; 27. 23-5 – *B. catenulatum*; 28. 20-5 – *B. catenulatum*; 30. 27-5 – *B. catenulatum*; 33. 17-5 – *B. catenulatum*; 34. 22-5 – *B. catenulatum*; 35. 24-5 – *B. catenulatum*. М – маркер молекулярного веса

Рис. 2. Электрофореграммы результатов ПЦР с видовыми праймерами. В лунках с соответствующими номерами представлены положительные образцы с различными видами бифидобактерий

Ценотипическая структура микробиоценоза представлена тремя возможными структурными вариантами видов бифидобактерий: 1) с одним видом – 5 образцов; 2) с двумя видами – 3; 3) с тремя видами – 3. У взрослых преобладал *B. longum* (у 6 из 7 лиц), у детей – также *B. longum*, но реже (у 2 из 4 лиц). Как у взрослых, так и у детей отмечено превалирование лиц с наличием одного вида бифидобактерий в кишечном биоценозе из определяемых нами четырех видов.

Полагаем, что такая разнообразная видовая архитектура бифидобактерий и ценотипическая структура кишечного микробиоценоза, полученная на небольшой выборке (11 человек), является отражением длительного воздействия внешней экологической компоненты, которая опосредованно через организм человека влияет на формирование микробиоценоза ЖКТ. Превалирование в структуре микробиоценоза пациентов с дисбиотическими нарушениями представителей только одного или двух видов бифидобактерий, возможно, является следствием некоего экологического прессинга и маркером формирования устойчивых дисбактериозов. Данные предположения нуждаются в дальнейших исследованиях.

### Выводы

1. Впервые в региональной медицинской и биологической практике применен и адаптирован метод ПЦР для родового и видового типирования бифидобактерий в ЖКТ человека.

2. *B. longum* определен как доминирующий вид бифидобактерий в выборке от населения промышленного города.

3. Выявлено 7 вариантов сочетаемости видов (видовая архитектура) бифидобактерий среди четырех определяемых.

4. Определена ценотипическая структура микробиоценозов ЖКТ по количеству сочетаемых видов: с одним, с двумя и тремя видами бифидобактерий.

5. Сделано предположение о том, что превалирование в микробиоценозах лиц с дисбиотическими отклонениями одно- и двухвидовых сочетаний бифидобактерий может свидетельствовать о нарушении микроэкологического гомеостаза данного биоценоза.

### Литература

1. Бондаренко. В. М. Молекулярно-генетические и молекулярно биологические исследования представителей родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* /

В. М. Бондаренко. // Вест. РАМН. – 2006. – №1. – С. 18–23.

2. Методические рекомендации по микробиологической диагностике дисбактериозов кишечника в лечебно-диагностических учреждениях армии и флота – СПб. : СПНИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 1999. – 36 с.

3. Новик Г. И. Исследование биохимических особенностей бифидобактерий на поздних стадиях развития популяций / Г. И. Новик, Н. И. Астапович, А. А. Самарцев // Микробиология, 2001. – Т. 70, № 4. – С. 495–502.

4. ПЦР в реальном времени. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ld.ru/catalog/rts/pcr/realtime-pcr.html>

5. Семенинский И. Ж. Молекулярные основы, принципы, алгоритм и возможности ПЦР – диагностики : метод. пособие. / И. Ж. Семенинский. – Иркутск, 1999. – 92 с.

6. Сидоренко А. В. Использование методов геносистематики в классификации и идентификации бактерий рода *Bifidobacterium* / А. В. Сидоренко // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 3. – С. 293–302.

7. Хавкин А. И. Эволюция представлений о роли кишечной микрофлоры [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.disbak.ru>.

8. Шульпекова Ю. О. О роли бифидобактерий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.kcn.ru/tat\\_ru/tet](http://www.kcn.ru/tat_ru/tet)

9. Arunachalam K. D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology / K. D. Arunachalam // *Nutrit. Res.* – 1999. – Vol. 19, № 10. – P. 1559–1597.

10. Kaufmann P. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR / P. Kaufmann et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – P. 1268–1273.

11. Matsuki T. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria / T. Matsuki, K. Watanabe, R. Tanaka // *Curr. Issues Intest. Microbiol.* – 2003. – Vol. 4. – P. 61–69.

12. Miguel G. New Real-Time Quantitative PCR Procedure for Quantification of *Bifidobacteria* in Human Fecal Samples / G. Miguel et al. – 2004. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.Ncbi.nlm.nih.gov>

13. Sakata S. Characterization of the genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping 16S rRNA gene sequences / S. Sakata et al. // *Microbiol. Immunol.* – 2006. – Vol. 50. – P. 1–10.

14. Ventura M. Identification and traicing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences / M. Ventura, V. Meylan, R. Zink // *Appl. and Environmental microbiology.* – 2003. – P. 4296–4301.

15. Yeung P. S. M. Species-specific identification of commercial probiotic strains / P. S. M. Yeung et al. // *J. Dairy Sci.* – 2002. – Vol. 85. – P. 1039–1051.

## Use of molecular-genetic methods for typification of bifidobacteria and the analysis of specific architectonic of intestinal microbiocenosis in population of the industrial city

Yu. P. Dzhioev<sup>1</sup>, E. G. Lamskov<sup>1</sup>, S.M. Popkova<sup>1</sup>, A. G. Leontyeva<sup>1</sup>, E. B. Rakova<sup>1</sup>, L. V. Mironova<sup>1</sup>, G. V. Jurinova<sup>2</sup>, V. P. Salovarova<sup>2</sup>, A.V. Lyapunov<sup>1</sup>, A. A. Pristavka<sup>2</sup>, P. A. Medvedeva<sup>2</sup>, A. I. Pilueva<sup>2</sup>, A. S. Volokitina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Epidemiology and Microbiology SCPFH HR SB RAMS, Irkutsk

<sup>2</sup> Irkutsk State University, Irkutsk

**Abstract.** For the first time in regional clinical practice the method of the polymerization chain reaction (PCR) for diagnostics of genera and species of bifidobacteria is used. The offered approach is adapted and optimised on conditions of diagnostic standards for working out of a method of identification and typification of bifidobacteria species in a multiplex variant. The received results of specific typification of bifidobacteria in population of an industrial city (Angarsk), somewhat reflect complexity of mechanisms of influence of external and internal factors on formation processes of intestines microbiocenosis, shown in a structural variety of specific architectonic of bifidobacteria in an human organism.

**Keywords:** Polymerization chain reaction, bifidobacteria, generic and specific probes, identification and typification, disbacteriosis.

*Джиоев Юрий Павлович*  
Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗС  
РЧ СО РАМН, 664025  
г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
кандидат биологических наук, старший научный  
сотрудник.  
E-mail: alanir07@mail.ru  
тел. (3952) 33–39–52  
E-mail: alanir07@mail.ru

*Dzhioev Yuri Pavlovitch*  
Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Scientific Centre of Family Health and Human  
Reproduction Problems SO RAMS  
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025  
Ph. D. of Biology, senior research scientist  
phone: (3952) 33–39–51,  
E-mail: alanir07@mail.ru

*Ламсков Евгений Геннадьевич,*  
Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗС  
РЧ СО РАМН  
664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
лаборант-исследователь  
тел. (3952) 33–39–52  
E-mail: lameji@mail.ru

*Lamskov Evgeni Genadevitch,*  
Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Scientific Centre of Family Health and Human  
Reproduction Problems SO RAMS  
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025  
laboratorian  
phone: (3952) 33–39–51  
E-mail: lameji@mail.ru

*Попкова Софья Марковна,*  
Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗС  
РЧ СО РАМН, 664025,  
г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией микроэкологии  
тел. (3952) 33–34–41

*Popkova Sofia Markovna,*  
Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Scientific Centre of Family Health and Human  
Reproduction Problems SO RAMS  
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025  
D. Sc. of Biology, Head of Laboratory of Microecology  
phone: (3952) 33–34–41

*Ракова Елена Борисовна*  
Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗС  
РЧ СО РАМН  
664025 г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
научный сотрудник  
тел. (3952) 33–34–41

*Rakova Elena Borisovna*  
Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Scientific Centre of Family Health and  
Human Reproduction Problems SO RAMS  
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025  
research scientist  
phone: (3952) 33–34–41

*Миронова Лилия Валерьевна*  
Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗС  
РЧ СО РАМН  
664025, г. Иркутск, ул. К.Маркса, 3  
кандидат медицинских наук, директор ИЭМ НЦ  
ПЗС РЧ СО РАМН  
тел. (3952) 24-03-52  
E-mail: mironova-ln@yandex.ru

*Mironova Lilia Valerevna*  
Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Scientific Centre of Family Health and  
Human Reproduction Problems SO RAMS  
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025  
Ph. D. of Medicine, director  
phone: (3952) 24-03-52  
E-mail: mironova-ln@yandex.ru

*Юринова Галина Валерьевна*  
Иркутский государственный университет  
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
кандидат биологических наук  
тел. (3952) 24-18-55

*Yurinova Galina Valerievna*  
Irkutsk State University  
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003  
Ph. D. of Biology, ass. prof., Department of Physical  
and Chemical Biology  
phone: (3952) 24-18-55

*Саловарова Валентина Петровна*  
Иркутский государственный университет  
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
зав. кафедрой физико-химической биологии  
доктор биологических наук, профессор.  
E-mail: vsalovarova@rambler.ru  
тел. (3952) 24-18-55

*Salovarova Valentina Petrovna*  
Irkutsk State University,  
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003  
D. Sc. of Biology, professor,  
Head of Department of Physical and Chemical Biology  
E-mail: vsalovarova@rambler.ru  
phone: (3952) 24-18-55

*Ляпунов Александр Валерьевич*  
Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗС  
РЧ СО РАМН,  
664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
кандидат биологических наук  
E-mail: liapunov.asp@mail.ru

*Liapunov Alexander Valerevitch*  
Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Scientific Centre of Family Health and  
Human Reproduction Problems SO RAMS  
3 K. Marx St., Irkutsk, 664025  
Ph. D. of Biology  
E-mail: liapunov.asp@mail.ru

*Приставка Александр Алексеевич*  
Иркутский государственный университет  
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
кандидат биологических наук,  
кафедра физико-химической биологии  
тел. (3952) 24-18-55

*Pristavka Alexander Alexseevitch*  
Irkutsk State University  
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003  
Ph. D. of Biology, ass. prof., Department of Physical  
and Chemical Biology  
phone: (3952) 24-18-55

*Медведева Полина Алексеевна*  
Иркутский государственный университет  
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5,  
студент  
тел. (3952) 24-18-55

*Medvedeva Polina Alekseevna*  
Irkutsk State University  
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003  
student  
phone: (3952) 24-18-55

*Пилуева Алена Ивановна*  
Иркутский государственный университет  
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
студент  
тел. (3952) 24-18-55

*Pilueva Alena Ivanovna*  
Irkutsk State University  
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003  
student  
phone: (3952) 24-18-55

*Волокитина Анна Степановна*  
Иркутский государственный университет  
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
студент  
тел. (3952) 24-18-55

*Volokitina Anna Stepanovna*  
Irkutsk State University  
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003  
student  
phone: (3952) 24-18-55