

## СКРИНИНГ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ С ВЫСОКОЙ ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

С целью поиска продуцентов целлюлозолитических ферментов был проведен скрининг аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИМВ НАНУ. Из 353 исследованных штаммов бактерий 206 штаммов (58,4 %) обладали способностью разлагать карбоксиметилцеллюлозу, 158 штаммов (44,8 %) – целлобиозу. При этом наиболее активно синтезировали как эндоглюканазу, так и целлобиазу 91 штамм (25,8 % от всех исследованных).

Показано, что биосинтез ферментов целлюлазного комплекса у бацилл имеет индуцибельный характер, а состав и активность его составляющих является регулируемым процессом и определяется как физиологическими особенностями штаммов, так и условиями их культивирования, в частности, составом питательной среды.

В результате скрининга отобраны штаммы бацилл с высоким уровнем ферментативной активности.

*Ключевые слова:* бактерии рода *Bacillus*, целлюлазы, скрининг.

Биоконверсия и широкое использование ежегодно возобновляемых растительных отходов, содержащих до 40 % тяжело разрушаемой и мало используемой целлюлозы, является одной из ключевых отраслей биотехнологии. Коммерческие ферменты для биоконверсии целлюлозосодержащих материалов в простые легкоусвояемые сахара малодоступны из-за их высокой стоимости, что препятствует их широкому внедрению в практику. В связи с этим актуальным представляется поиск штаммов микроорганизмов, способных продуцировать различные гидролитические ферменты, среди которых особый интерес представляет комплекс целлюлозолитических ферментов. Большая часть представленных в литературе исследований посвящена активным целлюлозам грибов [1, 2, 6].

В настоящее время в животноводстве для повышения питательной ценности кормов используются ферментные препараты не только из грибов, но и из бактерий рода *Bacillus* [5, 8, 12]. Амилосубтилин, протосубтилин, протомезентерин, бацелл, моноспорин из бацилл – это далеко не полный перечень кормовых ферментных добавок, которые оказывают позитивное влияние на обмен веществ у животных и птицы [2, 3, 5, 8, 10–12]. Однако, несмотря на это, поиск среди бацилл новых высокоактивных продуцентов с различной субстратной специфичностью и сегодня остается актуальной проблемой.

Цель данной работы – отбор штаммов с высокой целлюлазной активностью среди бактерий рода *Bacillus*.

**Материалы и методы.** Объектом исследований служили 353 штамма 23 видов бактерий рода *Bacillus* из коллекции отдела антибиотиков Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, изолированных из различных экониш (почва, лечебные грязи, желудочно-кишечный тракт животных и человека и др.).

Культивирование бактерий проводили в колбах на качалках в течение 2 суток при температуре 37°C на синтетической среде, содержащей (г/л): натрия цитрат – 1,29,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 4,75,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 9,6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,18. В качестве источника углерода вносили 0,5 % натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) или 0,2 % целлобиозы.

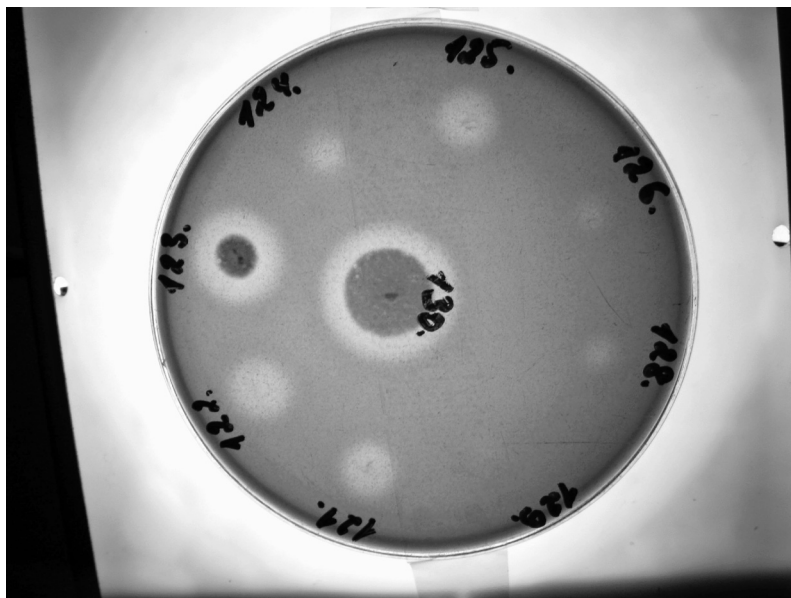
Образование и активность ферментов целлюлазного комплекса оценивали по их воздействию на субстраты: на Na-КМЦ – эндоглюканазы и на целлобиозу –  $\beta$ -глюкозидазы [4, 6].

Скрининг активных культур проводили в два этапа. Первый этап состоял из прямого отбора активных культур различных видов бактерий из их посевов на поверхность агаризованной среды с различными целлюлозосодержащими субстратами в качестве источника углерода. По диаметру зон просветления окраски вокруг выросших колоний после прокрашивания чашек красителем конго красным судили об активности продуцируемых культурами ферментов [4].

Активность ферментов у штаммов, отобранных в результате первого этапа, оценивали по способности гидролизовать растворимую, средней вязкости карбоксиметилцеллюлозу или целлобиозу, по содержанию образующихся при этом редуцирующих сахаров, которые

определяли с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты по предварительно построенной калибровочной кривой по глюкозе [7].

**Результаты и их обсуждение.** Отбор штаммов спорообразующих бактерий как потенциальных продуцентов целлюлаз при посеве культур на поверхность соответствующих по составу агаризованных сред показал, что культуры, которые способны образовывать активные целлюлазы, давали вокруг колоний зоны просветления, хорошо просматривающиеся после прокрашивания красителем (рис. 1).



**Рис. 1. Зоны гидролиза Na-КМЦ бациллами**

Обозначения: цифры означают рабочие номера штаммов; 123, 130 – зоны с синей окраской (в центре), 121, 122, 124, 125, 126, 128 – бледно-желтая окраска зон, 129 – зона отсутствует.

Первый этап скрининга показал, что в своем большинстве исследуемые штаммы, гидролизуют растворимую КМЦ и целлобиозу, обладают способностью образовывать комплекс внеклеточных целлюлаз. Однако такой способностью обладали не все исследованные штаммы (табл. 1 и 2). Так, штаммы видов *B. circulans*, *B. sphaericus*, *B. badius*, *B. lentus*, *B. bombycis*, *B. pasteurii*, *B. species*, *B. silvestris* не обладали способностью к образованию внеклеточных ферментов, расщепляющих КМЦ, и только единичные из них были способны гидролизовать целлобиозу.

Большая часть исследуемых штаммов бацилл синтезировали эндоглюканазу – 206 штаммов (58,4 %) и целлобиазу – 158 штаммов (44,8 %). Наиболее активными продуцентами целлюлозолитических ферментов оказались штаммы *B. subtilis*. Из 228 штаммов этого вида 160 (70,2 %) обладали только КМЦ-азной и 131 штамм (57,5 %) – только  $\beta$ -глюкозидазной активностью.

Из исследованных штаммов *B. licheniformis* (25 штаммов) активными оказались лишь 8 (32 %) и 7 штаммов (28 %) по КМЦ-азе и целлобиазе соответственно. Среди штаммов *B. cereus* активными были только 6 и 5 штаммов из 24, среди штаммов *B. megaterium* – 10 и 5 культур из 13 исследованных.

Зоны гидролиза диаметром до 10 мм на КМЦ выявлены у 103 штаммов *B. subtilis*, до 20 мм – у 58. Штаммов, образующих зоны большего диаметра, обнаружено всего 16, из них 12 – *B. subtilis* и по 1 штамму *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. oligonitrophilus*. При расщеплении целлобиозного субстрата наблюдалась обратная картина: лишь 53 штамма образовывали зоны до 10 мм, а большинство штаммов (96 шт.) образовывали зоны 20 мм. Штаммов, способных гидролизовать целлобиозу и образующих зоны более 20 мм, обнаружено 20. Из них 18 штаммов *B. subtilis* и по одному *B. alvei* и *B. pumilus*.

Таблица 1

Эндоглоканазная активность бактерий рода *Bacillus*

Вид бактерий	Общее количество штаммов	Количество активных штаммов в отношении На-КМЦ (диаметр зон гидролиза, мм)				
		0	до 10	до 20	более 20	более 25
<i>B. subtilis</i>	228	68	103	45	5	7
<i>B. licheniformis</i>	25	17	8	0	0	0
<i>B. cereus</i>	24	18	4	1	0	1
<i>B. megaterium</i>	13	3	4	5	0	1
<i>B. pumilus</i>	14	4	7	2	0	1
<i>B. coagulans</i>	3	2	1	0	0	0
<i>B. circulans</i>	4	4	0	0	0	0
<i>B. alvei</i>	3	2	1	0	0	0
<i>B. polymyxa</i>	2	0	0	2	0	0
<i>B. brevis</i>	3	3	0	0	0	0
<i>B. thuringiensis</i>	2	1	1	0	0	0
<i>B. firmus</i>	2	2	0	0	0	0
<i>B. laterosporus</i>	2	1	0	1	0	0
<i>B. sphaericus</i>	2	2	0	0	0	0
<i>B. badius</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. bombycis</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. lentus</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. pasteurii</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. macerans</i>	2	0	2	0	0	0
<i>B. pulvifaciens</i>	1	0	1	0	0	0
<i>B. species</i>	15	15	0	0	0	0
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	0	0	2	1	0
<i>B. silvestris</i>	1	1	0	0	0	0
Всего	353	147	132	58	6	10
В т.ч. активные	206	-	132	58	6	10
неактивные	147	147	-	-	-	-

Таблица 2

Целлюлазная активность бактерий рода *Bacillus*

Вид бактерий	Общее количество штаммов	Количество активных штаммов в отношении целлюлозы (диаметр зон гидролиза, мм)				
		0	до 10	до 20	более 20	более 25
<i>B. subtilis</i>	228	97	36	77	11	7
<i>B. licheniformis</i>	25	18	6	1	0	0
<i>B. cereus</i>	24	19	4	1	0	0
<i>B. megaterium</i>	13	8	3	2	0	0
<i>B. pumilus</i>	14	11	2	0	0	1
<i>B. coagulans</i>	3	3	0	0	0	0
<i>B. circulans</i>	4	3	0	1	0	0
<i>B. alvei</i>	3	2	0	0	0	1
<i>B. polymyxa</i>	2	1	1	0	0	0
<i>B. brevis</i>	3	2	0	1	0	0
<i>B. thuringiensis</i>	2	1	0	1	0	0
<i>B. firmus</i>	2	1	1	0	0	0
<i>B. laterosporus</i>	2	2	0	0	0	0
<i>B. sphaericus</i>	2	2	0	0	0	0
<i>B. badius</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. bombycis</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. lentus</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. pasteurii</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. macerans</i>	2	1	0	1	0	0
<i>B. pulvifaciens</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. species</i>	15	15	0	0	0	0
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	3	0	0	0	0
<i>B. silvestris</i>	1	1	0	0	0	0
Всего	353	195	53	85	11	9
в т.ч. активные	158	-	53	85	11	9
неактивные	195	195	-	-	-	-

При расщеплении как КМЦ, так и целлобиозы наблюдалась и различная окраска зон: вначале проявлялись зоны бледно-желтой окраски, а через 5–6 часов вокруг колоний в центре этих зон появлялась синяя окраска, что, возможно, можно объяснить различной активностью целлюлозолитических ферментов, различающихся, как правило, молекулярной массой, содержанием углеводов, аминокислот, что, исходя из данных разных авторов, является чрезвычайно характерным для продуцентов целлюлаз [1, 2, 6]. По данным некоторых исследователей, проявление желтых зон связано с образованием глюкозы, а синих зон – пентоз и/или целлоолигосахаридов [2, 6]. Этому процессу могут способствовать и различные условия культивирования.

Сводные данные первого этапа скрининга штаммов с целлюлозолитической активностью представлены в табл. 3. Полученные результаты позволили разделить исследованные 353 штамма бактерий рода *Bacillus* по способности расщеплять целлюлозные субстраты на три группы:

- 1) не использующие КМЦ и целлобиозу: 147 штаммов (41,6 %) и 195 штаммов (55,2 %) соответственно;
- 2) активно использующие только КМЦ – 206 штаммов (58,4 %) или только целлобиозу – 158 штаммов (44,8 %);
- 3) активно разлагающие как КМЦ, так и целлобиозу – 91 штамм (25,8 % от всех исследованных).

Таблица 3

Характеристика целлюлозолитических свойств бактерий рода *Bacillus* (по результатам скрининга)

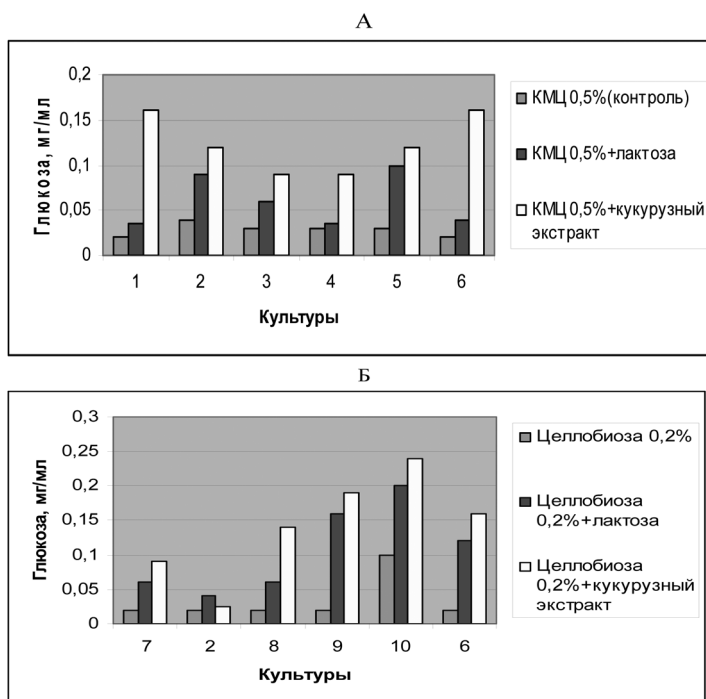
Вид бактерий	К-во исследованных штаммов	Количество активных штаммов					
		Субстраты					
		КМЦ		Целлобиоза		КМЦ и целлобиоза	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>B. subtilis</i>	228	160	70,2	131	57,5	79	34,6
<i>B. licheniformis</i>	25	8	32,0	7	28,0	3	12,0
<i>B. cereus</i>	24	6	25,0	5	20,8	1	41,7
<i>B. megaterium</i>	13	10	76,9	5	38,5	3	23,1
<i>B. pumilus</i>	14	10	71,4	3	21,4	1	7,1
<i>B. coagulans</i>	3	1	33,3	0	0	0	0
<i>B. circulans</i>	4	0	0	1	25,0	0	0
<i>B. alvei</i>	3	1	33,3	1	33,3	1	33,3
<i>B. polymyxa</i>	2	2	100,0	1	50,0	1	50,0
<i>B. brevis</i>	3	0	0	1	33,3	0	0
<i>B. thuringiensis</i>	2	1	50,0	1	50,0	0	0
<i>B. firmus</i>	2	0	0	1	50,0	0	0
<i>B. laterosporus</i>	2	1	50,0	0	0	0	0
<i>B. sphaericus</i>	2	0	0	0	0	0	0
<i>B. badius</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>B. bombycis</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>B. lentus</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>B. pasteurii</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>B. macerans</i>	2	2	100,0	1	50,0	1	50,0
<i>B. pulvificiens</i>	1	1	100,0	0	0	0	0
<i>B. species</i>	15	0	0	0	0	0	0
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	3	100,0	0	0	1	33,3
<i>B. silvestris</i>	1	0	0	0	0	0	0
Всего	353	206	58,4	158	44,8	91	25,8

Ферментные комплексы микроорганизмов с широкой субстратной специфичностью представляют повышенный интерес для сельского хозяйства. Они участвуют в процессах деградации различных по своему составу сырьевых компонентов корма и способствуют его оптимальному усвоению. Поэтому особого внимания заслуживают штаммы третьей группы как потенциальные продуценты ферментов целлюлазного комплекса, способные активно расщеплять оба субстрата. Они были отобраны нами для последующего этапа скрининга.

Это 79 штаммов *B. subtilis*, по 3 штамма *B. licheniformis* и *B. megaterium*, а также по 1 штамму *B. pumilus*, *B. alvei*, *B. polymyxa*, *B. oligonitrophilus*, *B. cereus* и *B. macerans*.

Для проведения этого этапа скрининга предполагалось отработать условия, оптимальные для синтеза целлюлозолитических ферментов отобранными штаммами. Для этого бактерии культивировали в глубинных условиях на жидкой синтетической среде, источником углерода в которой служили Na-КМЦ (0,5 %) или целлюбиоза (0,2 %), а в качестве индуктора целлюлазы были взяты лактоза (0,5 %) или кукурузный экстракт (0,5 %).

Исследование шести наиболее активных культур из отобранных 91 штамма показало, что оптимальным для проведения гидролиза целлюлозосодержащих субстратов был вариант среды, в которой в качестве индуктора использовали кукурузный экстракт. На среде без индуктора или с лактозой рост бактерий был более слабым и сопровождался незначительным образованием глюкозы в культуральной жидкости. На среде с кукурузным экстрактом была выявлена повышенная продукция глюкозы, что может свидетельствовать о присутствии в культуральной жидкости ферментов, глубоко гидролизующих целлюлозный субстрат (рис. 2). Эта среда была отобрана нами для дальнейших исследований.



**Рис. 2.** Показатели целлюлозолитической активности различных штаммов *B. subtilis* по содержанию образовавшейся глюкозы (мг/мл к.ж.) из Na-КМЦ (А) и целлюбиозы (Б) на различных вариантах среды.

Штаммы бактерий *B. subtilis* : 1– 34, 2– 2, 3– 3, 4– 51, 5– 39, 6– 62 , 7– 55, 8– 16, 9– 63, 10–13.

Так, в результате второго этапа скрининга отработаны условия, оптимальные для активного синтеза ферментов. Показано, что секреция внеклеточных целлюлаз у изучаемых бактерий представляет собой регулируемый процесс. Путем подбора эффективного индуктора в среде можно создать условия, способствующие активному биосинтезу ферментов [6, 13].

Наряду с этим был сделан вывод, что синтез ферментов целлюлозолитического комплекса зависит не только от физиологических особенностей продуцентов, но и от состава питательной среды. Из данных, приведенных на рис. 3, можно видеть, что активность целлюлозолитических ферментов у отобранных штаммов бактерий существенно варьирует. Самая высокая суммарная целлюлазная активность как эндоглюканазная, так и целлюбиазная была характерной для штаммов *B. subtilis* и *B. oligonitrophilus*.

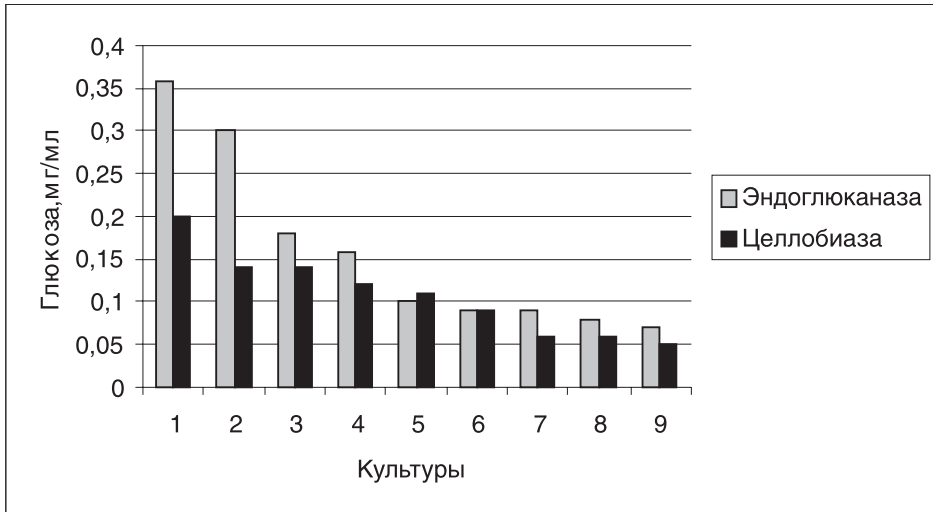


Рис. 3. Распределение эндоглюканазной и целлюбиазной активностей бактерий по количеству образующейся глюкозы (мг/мл культуральной жидкости)

- 1 – *B. subtilis* (79 штаммов)
- 2 – *B. oligonitrophilus* (1 шт.)
- 3 – *B. cereus* (3 шт.)
- 4 – *B. megaterium* (3 шт.)
- 5 – *B. licheniformis* (3 шт.)
- 6 – *B. pumilus* (1 шт.)
- 7 – *B. alvei* (1 шт.)
- 8 – *B. polymyxa* (1 шт.)
- 9 – *B. macerans* (1 шт.)

Таким образом, в результате скрининговых исследований 353 штаммов бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 23 видам, отобраны штаммы с высокой целлюлолитической активностью: эндоглюканазной (284,1-525,8 ед/мл) и  $\beta$ -глюкозидазной (84,5-95,0 ед/мл) (табл. 4). Отобранные штаммы могут быть использованы в качестве исходных в дальнейших биотехнологических исследованиях и для апробации в составе биопрепаратов, применяемых в качестве кормовой добавки.

Таблица 4

Активность ферментов целлюлолитического комплекса, отобранных в результате скрининга штаммов бацилл

Штамм бактерий	Эндоглюканаза		$\beta$ -глюкозидаза	
	мг глюкозы/мл	ед/мл	мг глюкозы/мл	ед/мл
<i>B. subtilis</i> 55 ЛГ	0,34±0,09	525,8	0,19±0,05	87,5
<i>B. subtilis</i> 30S	0,30±0,06	508,2	0,17±0,03	86,0
<i>B. subtilis</i> 229 Ж	0,28±0,12	495,0	0,14±0,04	85,0
<i>B. subtilis</i> 1872	0,37±0,08	583,0	0,25±0,05	94,0
<i>B. subtilis</i> MC-22	0,32±0,05	517,0	0,24±0,05	93,5
<i>B. subtilis</i> MC-63	0,26±0,04	357,3	0,19±0,02	87,5
<i>B. subtilis</i> MC-132	0,19±0,03	284,1	0,24±0,01	93,5
<i>B. subtilis</i> 49 ЛГ	0,24±0,02	341,1	0,18±0,02	86,0
<i>B. subtilis</i> 45 ЛГ	0,24±0,07	341,1	0,12±0,06	84,5
<i>B. cereus</i> 63	0,30±0,06	508,2	0,19±0,02	87,5
<i>B. oligonitrophilus</i> 234-002	0,345±0,16	508,2	0,31±0,07	95,0

## СКРИНІНГ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ З ВИСОКОЮ ЦЕЛЛЮЛАЗНОЮ АКТИВНІСТЮ

### Резюме

З метою пошуку продуцентів целлюлозолітичних ферментів було проведено скринінг аеробних споруруючих бактерій роду *Bacillus* із колекції ІМВ НАНУ. З 353 досліджених штамів бактерій 206 штамів (58,4 %) здатні розкладати карбоксиметилцелюлозу, 158 штамів (44,8 %) – целобіозу. При цьому найбільш активно синтезували як ендоглюканазу, так і целобіазу 91 штамп (25,8 % від всіх досліджених).

Показано, що біосинтез ферментів целюлазного комплексу у бацил має індукцибельний характер, а склад та активність його складових є регульованим процесом і визначається як фізіологічними особливостями штамів, так і умовами їх культивування, зокрема, складом поживного середовища.

В результаті скринінгу відібрані штами бацил з високим рівнем ферментативної активності.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, целюлази, скринінг.

*A.I. Osadcha, L.A. Safronova, L.V. Avdeyeva, V.M. Ilyash*

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

## SCREENING OF BACTERIA STRAINS WITH HIGH CELLULASE ACTIVITY

### Summary

Screening of aerobic sporulating bacteria of *Bacillus* genus from the collection of IMV of NAS of Ukraine was performed to search for producers of cellulolytic enzymes. Only 206 strains (58.4%) of 353 studied bacteria strains are capable to decompose carboxymethylcellulose, 158 strains (44.8%) – cellobiose. Under these conditions 91 strains (25% of all studied ones) synthesized actively both endoglucanase and cellobiase.

It was shown that biosynthesis of enzymes of cellulose complex in bacilli was of inducible character, while the composition and activity of its components was a regulated process and was determined both by physiologic features of strains and by the conditions of their cultivation, composition of nutrient medium in particular.

The strains of bacilli with high level of fermentation activity were selected as a result of screening.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Bacillus* genus bacteria, cellulases, screening.

The author's address: A.I. Osadcha, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Безбородов А.М., Астапович Н.И. Секрция ферментов у микроорганизмов. – Москва: Наука, 1984. – 72 с.
2. Билай В.И., Пидопличко Н.М., Тарадий Г.В. Целлюлолитические свойства плесневых грибов и принципы отбора активных продуцентов целлюлаз // Ферментное расщепление целлюлозы. – М.: Наука, 1967. – С. 37–45.
3. Кацаев А., Петренко А., Калаишиков А. Кормовые добавки на основе живых культур микроорганизмов // Птицеводство. – 2006. – № 11. – С. 43–45.
4. Клесов А.А., Рабинович М.Л. Ферментативный гидролиз целлюлозы // Биологическая химия. Итоги науки и техники. – Москва, 1982. – Т. 8, № 11. – С. 1490–1496.
5. Преображенский С.Н. Фармакодинамические основы и перспективы применения ферментных препаратов в животноводстве // Ветер. с.х. жив. – 2006. – № 1. – С. 71–75.
6. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизмы действия целлюлаз // В сб. "Итоги науки и техники ВИНТИ". Биотехнология. – 1988. – Т. 11. – С. 1–224.
7. Рухлядева А.П., Полягина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. – Москва: Легк. и пищ. промышленность, 1981. – 288 с.

8. Рядчиков В., Петренко А., Радуль А. Бацелл в кормах для кур и ремонтного молодняка // Птицеводство. – 2005. – № 1. – С. 23–24.
9. Сеницын А.П., Митькевич О.В., Калюжный С.В., Клесов А.А. Изучение синергизма в действии ферментов целлюлазного комплекса // Биотехнология. – 1987. – № 1. – С. 39–46.
10. Ушакова Н.А., Белов Л.П., Варшавский А.А., Козлова А.А., Колганова Т.В., Булыгина Е.С., Турова Т.П. Расщепление целлюлозы при дефиците азота бактериями, выделенными из кишечника растительноядных позвоночных // Микробиол. журн. – 2003. – 72, № 3. – С. 400–406.
11. Fumiyasu F., Toshiaki K., Koki H. Purification and Properties of a Cellulase from Alkalophilic *Bacillus* sp. № 1139 // J. of Gen. Microbiol. – 1985. – 131. – P. 3339-3345.
12. Gierasimiuk J., Strzelczyk E. Cellulolytic and pectolytic activity of bacilli isolated from the root-free soil and the rhizosphere of different forest trees // Folia forest. pol. A. – 2003. – № 45. – P. 15-26.
13. Krohn B.M., Lindsay J.A. Purification, characterization and comparison of an glucosidase (endo- oligo -1.4- glucosidase) from the mesophile *Bacillus subtilis* and the obligate thermophile *Bacillus caldolyticus* // Curr. Microbiol. – 1991. – 22, № 2. – P. 133–140.

Отримано 12.10.2008