

На правах рукописи

КИЧЕМАЗОВА Наталья Валентиновна

**ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ
РОДОВ *XANTHOBACTER* И *ANCYLOBACTER*: ХАРАКТЕРИСТИКА
И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Саратов – 2019

Работа выполнена на кафедре микробиологии, биотехнологии и химии в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», г. Саратов

Научный руководитель

доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Заднова Светлана Петровна

кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук

Федоненко Юлия Петровна

Ведущая организация:

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (450054, Российская Федерация, Республика Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, 69)

Защита диссертации состоится _____ 2019 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: 8 (342) 2809211.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.ed.gov.ru>) и сайте «ИЭГМ УрО РАН» (<http://www.iegм.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте института (<http://www.iegм.ru>).

Автореферат разослан “___” _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время возрастает роль бактериальных экзополисахаридов (ЭПС) в различных сферах человеческой деятельности: в нефтяной промышленности, медицине, косметике, пищевом производстве, сельском хозяйстве (Sandford, Cotterell, Pettitt, 1984; Garcia-Ochoa, Santos, Casas *et al.*, 2000; Zanchetta, Lagarde, Guezennec, 2003; Kumar, Mody, Andhare, 2007; Moran, Holst, Brennan *et al.*, 2009; Roca, Alves, Freitas *et al.*, 2015; Schmid, Sieber, Rehm, 2015; Vasiliu, 2016; Leroy, De Vuyst, 2016). В мире спрос на ЭПС превышает предложение, это связано с тем, что в каждой отрасли требуются биополимеры с различными характеристиками: как функциональными – способность растворяться в воде, создавать высоковязкие растворы и студни, так и биологическими – иммуномодулирующими, противовоспалительными, бактерицидными, радиопротекторными, ранозаживляющими, противоопухолевыми, антиканцерогенными (Ермольева, Вайсберг, 1976; Вудсайд, Кваринский, 1977; Гринберг, Пирог, Малашенко, 1992; Sandford, Cotterell, Pettitt, 1984; Crescenzi, 1995; Chen, Yuan, Shan, 2013; Gugliandolo, Spanò, Lentini *et al.*, 2014; Jones, Paynich, Kearns, 2014; Gugliandolo, Spanò, Maugeri *et al.*, 2015). Поэтому большое внимание уделяется поиску и изучению продуцентов полисахаридов, а также исследованию и практическому внедрению этих полимеров (Наумов, Дмитриев, Пенкин, 2004; Заднова, Смирнова, 2010; Смолькина, Качала, Федоненко и др., 2010; Логинов, Худайгулов, Четвериков и др., 2011; Мелентьев, Логинов, Бойко и др., 2017; Brummer, Cui, 2006; Harrah, Panilaitis, Kaplan, 2006; Andhare, Chauhan, Dave *et al.*, 2014; Madhuri, Prabhakar, 2014; Roca, Alves, Freitas *et al.*, 2015; Vijayendra, 2015). Экзопалисахариды бактерий обладают уникальными физико-химическими, биологическими и функционально-технологическими свойствами (Ермольева, Вайсберг, 1976; Афонская, Колесова, 1980; Гринберг, Пирог, Малашенко, 1992; Беседнова, Иванушко, Звягинцева и др., 2000; Правдивцева, Карпунина, Нурмухамедов и др., 2009; Zhang, Bishop, Kupferle, 1998; Zanchetta, Lagarde, Guezennec, 2003; Seoud, Heinze, 2005; Vinderola, 2006; Egorenkova, Tregubova, Matora *et al.*, 2007; Kodali, Sen, 2008; Holst, Moran, Brennan, 2009; Ciszek-Lenda, Nowak, Śróttek *et al.*, 2011; Chabot, Yu, Léséleuc *et al.*, 2011).

Бактериальные ЭПС наиболее перспективны с точки зрения биотехнологии по сравнению с полисахаридами растительного и животного происхождения. Это связано с возможностью регулирования свойств ЭПС в зависимости от условий культивирования бактерий, а также выращивания их на дешевых субстратах, таких как отходы производств (Елинов, 1982; Кочетков, 1994; Sutherland, 1979; 2005). Помимо этого, в отличие от полисахаридов растительного происхождения, бактериальные – не зависят от климатических условий.

Степень разработанности темы исследования. Бактерии родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter* встречаются в ультрапресных кислых дистрофных водах Северных болот России. Они вносят весомый вклад в круговорот углерода в экосистеме, участвуя в начальной стадии разложения древесины (Васильева, Заварзин, 1995). О бактериях рода *Xanthobacter* и *Ancylobacter* упоминается в статьях (Raj, 1983; Wiegel, 2006). Данные о структуре и свойствах ЭПС этих бактерий немногочисленны. Так, в работе (O'Neill, Darvill, Albersheim, 1990) имеются сведения о химических свойствах ЭПС бактерий *Xanthobacter* sp., работ относительно ЭПС бактерий рода *Ancylobacter* нам не известны. Виды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 впервые были описаны в 2010 году (Зайчикова, Берестовская, Акимов и др., 2010). ЭПС этих культур к началу наших исследований не были изучены, что определяет большую теоретическую значимость данной работы. Кроме того, интерес к этим бактериям обусловлен и экономической выгодой, так как они потребляют органический субстрат в низкой концентрации и в

дальнейшем могут расширить спектр применяемых в практических целях биополимеров. В связи с этим исследования, посвященные изучению ЭПС бактерий *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056, являются актуальными и могут иметь важное научное и прикладное значение.

Цель работы состояла в выделении экзополисахаридов бактерий *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и *Ancylobacter abiegnus* Z-0056, а также характеристике их основных физико-химических и биологических свойств.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Подобрать оптимальные условия культивирования *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 (состав питательной среды, температура, pH, время культивирования) для обеспечения максимального продуцирования экзополисахаридов в лабораторных условиях.

2. Выделить и очистить экзополисахариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 из культуральной жидкости.

3. Определить молекулярную массу, моносхаридный состав и вязкость растворов полученных экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056.

4. Изучить влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на микроорганизмы, встречающиеся в естественной среде обитания этих бактерий (*Singulisphaera mucilaginoso* Z-0071, *X. xylophilus* Z-0055, *A. abiegnus* Z-0056) и тест-культур (*Pseudomonas aeruginosa* 27533, *Escherichia coli* 01, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Bacillus cereus* 8035, *Candida albicans* 230).

5. Изучить влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на инфузории *Colpoda stenii* и организм лабораторных животных.

6. Изучить влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на микрофлору толстого кишечника лабораторных мышей.

Научная новизна

Впервые обнаружены и охарактеризованы ЭПС бактерий *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056, подобраны условия для оптимальной продукции ЭПС (состав питательной среды, температура, pH, время культивирования). Показано, что *X. xylophilus* Z-0055 максимально продуцируют экзополисахариды на среде МС при 31°C, pH 5,5 на 100 часов культивирования, а *A. abiegnus* Z-0056 – на среде МСО при 25°C, pH 5,5 на 100 часов культивирования. Впервые выделены и очищены ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056, определены их молекулярные массы, углеводный состав и вязкость растворов. Установлено, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 усиливают рост некоторых бактерий, естественного местообитания лишь в концентрации 1,0 г/л, в то время как концентрации 0,25 и 0,5 г/л такого действия не оказывают. Показано, что концентрации ЭПС 0,25; 0,5 и 1,0 г/л усиливают рост *P.aeruginosa* 27533 и не влияют на рост таких микроорганизмов как *E. coli* 01, *S. aureus* 209-P, *B. cereus* 8035, *C. albicans* 230. Получены данные о токсическом действии ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на инфузории *C. stenii* в концентрации 1,0 г/л. Обнаружено, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 оказывают различное влияние на показатели белкового, углеводного, липидного, азотистого, водно-солевого обменов у лабораторных беспородных мышей. Показано, что введение ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в организм мышей в дозе 0,06 г/кг способствует увеличению количества молочнокислых бактерий в толстом кишечнике в 2 и 4 раза, а в дозе 3,0 г/кг – в 40 и 80 раз соответственно.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные результаты расширяют представление о составе и свойствах экзогликанов и вносят существенный вклад в фундаментальные исследования экзополисахаридов бактериального происхождения. По материалам диссертационной работы получены 2 патента на

изобретения «Способ получения экзополисахарида бактерий *Ancylobacter abiegnus*» (№ 2017144046 от 31.07. 2018, бюл. № 22), «Способ получения экзополисахарида бактерий *Xanthobacter xylophilus*» (№ 2017144093 от 15.08.2018, бюл. № 23) и опубликованы методические рекомендации «Определение биологических свойств бактериальных экзополисахаридов» (в соавторстве с М.Н. Денисовой, Е.Н. Бухаровой, Л.В. Карпуниной, 2014) для студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов, специалистов микробиологических и биотехнологических лабораторий, рекомендованные Учебно-методической комиссией и одобренные Ученым советом факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова (протокол № 3 от 18.02.2014 г.). Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций по микробиологии, биотехнологии, проведении лабораторно-практических занятий и написании дипломных работ в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» и ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Методология и методы исследования. Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам выделения и очистки экзополисахаридов, изучению их химического состава, физико-химических и биологических свойств. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы. При проведении исследования и изложения материала были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оптимальными условиями культивирования для наибольшей продукции экзополисахаридов для *X. xylophilus* Z-0055 являются: температура 31 °С; рН 5,5; время культивирования 100 ч на среде МС, а для *A. abiegnus* Z-0056 – 25 °С; рН 5,5; время культивирования 100 ч на среде МСО.

2. Выделенный из культуральной жидкости ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 представлен нейтральной и кислой фракциями в равном соотношении с молекулярными массами 10-20 кДа, 30-40 кДа соответственно и характеризуются разным моносахаридным составом: нейтральная фракция является глюкогалактоманнаном с соотношении 1:2:2; кислая фракция – ксилоталактоглюкоуронаном с соотношении 2:1:1; 1% раствор ЭПС при +25 °С имеет динамическую вязкость 58 мПа·с. Экзополисахарид *A. abiegnus* Z-0056 обладает молекулярной массой 10-20 кДа и состоит из кислой фракции, является глюкоманногалактоуронаном с соотношении 1:2:2; 1% раствор ЭПС при +25 °С имеет динамическую вязкость 52 мПа·с.

3. Экзополисахариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 способствуют увеличению биомассы бактериальных клеток своих продуцентов и *S. mucilaginosus* Z-0071, обитающих в ультрапресных дистрофных водах Северных болот России в концентрации 1,0 г/л и бактерий *P. aeruginosa* 27533 в концентрациях 0,25, 0,5, 1,0 г/л. Экзополисахариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в концентрации 1,0 г/л оказывают токсичное действие на инфузории *C. stenii*. В дозе 0,06 г/кг и 3,0 г/кг данные ЭПС оказывают различное влияние на метаболические процессы (белковый, углеводный, липидный, азотистый, водно-солевой) у лабораторных беспородных мышей. Экзополисахариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в дозе 0,06 г/кг увеличивают количество

молочнокислых бактерий в толстом кишечнике мышей в 2 и 4 раза, а в дозе 3,0 г/кг – в 40 и 80 раз соответственно.

Апробация работы:

Материалы диссертации были представлены на: конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам работы 2010-2018 гг. (Саратов, 2011; 2012; 2013; 2014; 2016; 2018); IV Всероссийской школе-конференции «Химия и биохимия углеводов» (Саратов, 2011); IV Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (Саратов, 2012); 8-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2014); II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014), Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы» (Саратов, 2014).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 19 работ, из них 5 статей из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК РФ (из них 1 статья в журнале, индексируемом в международных базах данных Scopus и Web of Science), и 2 патента.

Личный вклад соискателя состоит в подготовке и проведении экспериментальных исследований на всех этапах диссертационной работы, интерпретации полученных результатов, оформлении патентов, участии в подготовке публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, двух глав: обзора литературы и экспериментальной части, включающей описание объектов и методов исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа изложена на 121 странице, содержит 19 таблиц, 25 рисунков. Список литературы включает 286 наименований, в том числе 182 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования явились культуры *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056, полученные из лаборатории реликтовых микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. В работе также использовали бактерии *S. mucilaginosa* Z-0071, полученные из лаборатории реликтовых микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; тест-штаммы бактерий *P. aeruginosa* 27533, *E. coli* 01, *S. aureus* 209-P, *B. cereus* 8035, полученные из музея микроорганизмов кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» и грибы – *C. albicans* 230, полученные из музея культур Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии».

Культуры бактерий *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 выращивали в колбах при встряхивании на «Шейкер-инкубаторе ES-20» (Biosan, Литва) при температуре 25 и 31 °С.

Для исследования роста клеток и выделения ими ЭПС культуры *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 выращивали в жидких ультрапресных минеральных средах (Cohen-Bazire, Sistrom, Stanier, 1957; Зайчикова, Берестовская, Акимов и др., 2010).

Среда МС (на 1 л): 1 мл основы АТСС; 1 г сукцината; 0,1 г дрожжевого экстракта; 1 мкл витаминов; рН 5,5-5,6. Основа АТСС: модифицированные соли Хартнера ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 29,7 г; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 3,34 г, NH_4MoO_4 – 9,25 г, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 99,0 мг; раствор микроэлементов – 50,0 мл), H_2O – 1000 мл. Раствор микроэлементов: ЭДТА – 0,25 г; $ZnSO_4$ – 1,1 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5 г; $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 0,15 г; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,04 г; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 20,8 г. Витамины: биотин – 20 мг, фолиевая кислота – 20 мг, тиамин – 25 мг, пантотен – 25 мг, B_{12} – 1 мг, рибофлавин – 25 мг, никотинамид – 25 мг, п-аминобензойная кислота – 5 мг, бензоатная кислота – 25 мг, пиридоксин – 20 мг, этанол (70%) – 100 мл.

Среда МСО имеет тот же состав, что среда МС, но содержит дополнительные источники азота и фосфора: 0,25 г NH_4NO_3 ; 0,071 г KH_2PO_4 .

Наличие белков определяли по методу М. Бредфорд (1976), общее содержание углеводов – фенол-серным методом (Dubois, Cilles, Hamilton, 1956).

Содержание нуклеиновых кислот определяли при 260 нм на спектрофотометре «Cary 100 Scan» (Varian, США) (Остерман, 1985).

Для разделения полисахаридов на фракции методом ионообменной хроматографии использовали колонку $15,0 \times 1,5$ см с носителем Toyopearl DEAE 650(M) (Tosoh Bioscience, Япония). Элюирующий раствор – 0,05 М KH_2PO_4 (рН 6,8). Кислые фракции элюировали NaCl в градиенте концентрации 0 - 1 М. Скорость потока – 1,2 мл/мин.

Для определения моносахаридного состава использовали тонкослойную, высокоэффективную жидкостную и газожидкостную хроматографии.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках DC-Alufolien Cellulose (Fluka) или Polygram Cell 300 (Macherey-Nagel) в системе пиридин - этилацетат - уксусная кислота - вода в соотношении 5:5:1:3. Проявление хроматограмм проводили обработкой пластинки 1% спиртовым раствором кислого анилин-фталата с последующим нагреванием при 105 °С (Остерман, 1985; Варбанец, Здоровенко, Книрель, 2006).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на жидкостном хроматографе Smartline 1000 (Knauer, Германия) с пульсирующим амперометрическим детектором Dekade II (Antec Leiden, Голландия) на колонке CarboPac 10 (Dionex, США) размером 4×250 мм в 0,0125 М растворе NaOH, скорость потока – 0,7 мл/мин; чувствительность метода – 10-50 нг/мл.

Газожидкостную хроматографию (ГЖХ) проводили на хроматографе Shimadzu 2010 (Япония), капиллярная колонка Equity - 1 (Supelco, США). Газ-носитель – гелий, скорость потока 1,0 мл/мин, температура испарителя – 250 °С, интерфейса – 280 °С, градиент температуры термостата – 185 - 280 °С со скоростью 5 °С/мин.

Определение молекулярных масс ЭПС проводили методом гель-хроматографии на колонке (7500×250 мм) с Toyopearl HW-55F («Tosoh Bioscience», Япония), используя установку с перистальтическим насосом Bromma 2132 («ЛКВ», Швеция), рефрактометром RIDK 101 и самописцем line recorder TZ 4620 («Laboratorní přístroje», Чехия). Элюцию осуществляли 2%-ной уксусной кислотой со скоростью потока 1,4 мл/мин. В качестве маркеров молекулярной массы использовали декстраны с молекулярными массами 1,5, 5, 15, 110 и 2000 кДа.

Динамическую вязкость 1% растворов ЭПС измеряли при помощи ротационного вискозиметра Viscotester 7R (Германия) при температуре 25 °С с ротором R1.

Влияние ЭПС на бактерии и грибы изучали методами серийных разведений и диффузии в агар (Лабинская, Волина, 2010).

Токсичность ЭПС определяли согласно ГОСТ 13496.7 – 97 на инфузориях *C. stentii* и белых беспородных мышях. Инфузории и мыши были получены из Пензенской областной ветеринарной лаборатории.

Исследование токсичности ЭПС на лабораторных мышах проводили для оценки степени опасности однократного перорального введения малой и относительно высокой доз - 0,06 и 3 г на 1 кг массы тела животного соответственно.

Для исследования были взяты беспородные белые мыши самцы в возрасте 1-1,5 месяца массой тела 22 - 25 г, которых распределяли в клетки по 5 особей. Перед изучением влияния ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на организм мышей выдерживали карантин – 21 день. Лабораторных животных содержали по общепринятым методикам (Башенина, 1975). Гистологические исследования проводили по стандартной методике (Меркулов, 1956). Кровь исследовали с помощью автоматического гематологического анализатора «Рерс Vet». Общий анализ мочи проводили по стандартной методике (Козловская, 1984).

Общее количество бактерий и количество молочнокислых бактерий в толстом кишечнике мышей определяли методом серийных разведений (Лабинская, Волина, 2010).

Экспериментальные исследования выполняли в соответствии с требованиями Федерального закона от 01.01.1997 г. «О защите животных от жестокого обращения» и положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г.).

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам (Воробьев, Елсуков, 1989).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние условий культивирования на рост и продукцию экзополисахаридов бактериями *X. xylophilus* Z-0055

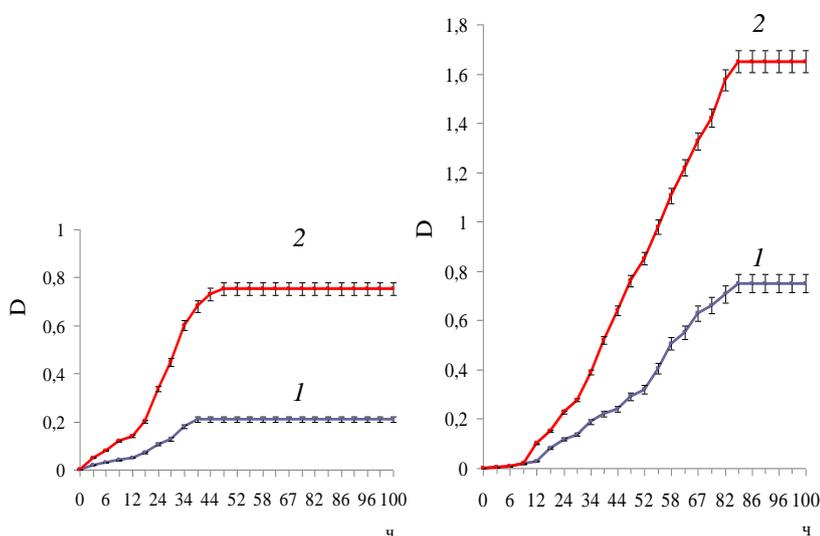


Рисунок 1 – Динамика роста и выхода ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 при 31° С на средах МС (А) и МСО (В)
Примечание – 1 - рост (λ_{425} нм), 2 - выделение ЭПС (λ_{490} нм).

Был осуществлен подбор режимов культивирования (температура, аэрация). Был изучен рост культур *X. xylophilus* Z-0055 и выход ЭПС на средах МС и МСО с различным содержанием количества азота и фосфора и источников углерода в качестве субстрата (сукцинат, оксалат, цитрат, ксилан, ксилоза).

Бактерии культивировали 150 ч при температуре 25°С. Продукция ЭПС начиналась с 20 ч и продолжалась до 50-55 ч на среде МС и до 80-85 ч на среде МСО и была стабильна до 120 ч роста культуры на среде МС и 145 ч на среде МСО, после чего происходил ее спад.

Количество экзополисахарида на 100 ч роста было $0,1 \pm 0,01$ г/л культуральной жидкости (МС) и $0,25 \pm 0,01$ г/л на среде МСО.

При температуре 31°С продукция экзополисахарида *X. xylophilus* Z-0055 на среде МС начиналась с 5 ч и продолжалась до 90 часов, на среде МСО с началом роста культуры и до 65-70 ч (Рисунок 1), продукция ЭПС была стабильна до 110 ч роста культуры на среде МС и 105 ч на среде МСО, после чего происходил ее спад.

Количество экзополисахарида на 100 часов роста было $0,3 \pm 0,01$ г/л культуральной жидкости (МС) и $0,1 \pm 0,01$ г/л на среде МСО. Количество ЭПС на 1 г сырых клеток на среде МС составило 0,6 г с 1 г клеток, на среде МСО – 0,1 ЭПС с 1 г клеток.

Таким образом, на среде с минимальным содержанием азота и фосфора (МС) наблюдали образование меньшего количества клеток и увеличение продукции ЭПС на единицу биомассы.

Было проведено выяснение влияния аэрации на рост *X. xylophilus* Z-0055, продукцию клетками ЭПС в различных условиях (без встряхивания, при 100 и 200 об/мин). Максимальная продукция ЭПС была получена при выращивании клеток культур с аэрацией при встряхивании со скоростью 200 об/мин на среде МСО.

При исследовании различных концентраций нитрата аммония (0,125; 0,25; 0,5 г/л) и дигидрофосфата калия (0,035; 0,07; 0,14 г/л) на рост бактерий и продукцию ими ЭПС было обнаружено, что рост культуры *X. xylophilus* Z-0055 был наилучшим ($17,0 \cdot 10^8$ клеток/мл) при концентрации нитрата аммония 0,5 г/л в среде МС (Таблица 1), а наибольшую продукцию ЭПС (144,1 мг/л) наблюдали при концентрации 0,25 г/л.

Таблица 1 – Влияние различных концентраций нитрата аммония на рост и продукцию ЭПС *X. xylophilus* Z-0055

Время, ч	Содержание в среде NH_4NO_3 , г/л						Контроль, без NH_4NO_3	
	0,125		0,25		0,5		Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л
	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л		
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
10	$2,0 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,2^*$	$2,0 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,3^*$	$2,0 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2^*$	$1,3 \pm 0,3$	$19,4 \pm 1,1$
20	$3,8 \pm 0,2^*$	$9,0 \pm 0,3^*$	$3,8 \pm 0,3^*$	$9,0 \pm 0,5^*$	$3,8 \pm 0,4^*$	$8,0 \pm 0,4^*$	$1,3 \pm 0,5$	$75,0 \pm 0,8$
50	$5,0 \pm 0,6$	$31,0 \pm 0,5^*$	$5,5 \pm 0,4$	$100,2 \pm 2,1^*$	$15,0 \pm 0,5^*$	$53,0 \pm 0,7^*$	$5,0 \pm 0,2$	$118,2 \pm 2,8$
100	$14,1 \pm 0,7^*$	$45,0 \pm 0,7^*$	$12,8 \pm 0,7^*$	$144,1 \pm 2,6^*$	$17,0 \pm 0,8^*$	$72,0 \pm 1,3^*$	$5,0 \pm 0,4$	$118,4 \pm 4,3$

Примечание – $p < 0,05^*$ - относительно контроля.

При добавлении в среду МС различных концентраций дигидрофосфата калия наилучший рост культуры *X. xylophilus* Z-0055, а также наибольшую продукцию ЭПС наблюдали при концентрации 0,14 г/л, но не превышала продукцию ЭПС клетками в контроле (без добавления дигидрофосфата калия) (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние различных концентраций дигидрофосфата калия на рост и продукцию ЭПС *X. xylophilus* Z-0055

Время, ч	$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,035 г/л		$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,07 г/л		$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,14 г/л		Контроль, без $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	
	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л
		$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
10	$2,1 \pm 0,2^*$	$15,0 \pm 0,1^*$	$2,0 \pm 0,1^*$	$15,0 \pm 0,3^*$	$2,3 \pm 0,1^*$	$13,0 \pm 0,8^*$	$1,3 \pm 0,3$	$19,4 \pm 1,1$
20	$4,5 \pm 0,6^*$	$17,0 \pm 0,5^*$	$5,0 \pm 0,8^*$	$17,0 \pm 0,5^*$	$4,4 \pm 0,5^*$	$30,0 \pm 0,2^*$	$1,3 \pm 0,5$	$75,0 \pm 0,8$
50	$7,0 \pm 0,8^*$	$38,0 \pm 1,4^*$	$7,4 \pm 1,0^*$	$38,2 \pm 0,2^*$	$6,9 \pm 0,2^*$	$103,4 \pm 0,8^*$	$5,0 \pm 0,2$	$118,2 \pm 2,8$
100	$19,0 \pm 0,9^*$	$61,0 \pm 1,2^*$	$18,0 \pm 0,7^*$	$74,5 \pm 0,4^*$	$20,3 \pm 0,4^*$	$130,0 \pm 3,0^*$	$5,0 \pm 0,4$	$118,4 \pm 4,3$

Примечание – $p < 0,05^*$ - относительно контроля.

При культивировании *X. xylophilus* Z-0055 на средах с различными источниками

углерода было обнаружено, что наилучший рост был на средах с ксиланом в концентрации 1,0 г/л и с сукцинатом в концентрации 3,0 г/л. Продукция ЭПС была наибольшей на средах с сукцинатом 3,0 г/л и 1,0 г/л (124±1,0 мг/л и 105±50 мг/л соответственно) (Таблица 3). Следует отметить, что добавление дополнительных источников азота и фосфора в среду МС способствует росту клеток продуцента, при этом продукция ЭПС с клетки снижается.

Таблица 3 – Влияние источников углерода в различных концентрациях на рост и продукцию ЭПС *X. xylophilus* Z-0055

Источник углерода	Концентрация источника углерода 1,0 г/л		Концентрация источника углерода 3,0 г/л	
	Количество клеток ×10 ⁸ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток ×10 ⁸ кл./мл	Количество ЭПС мг/л
	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m
сукцинат	4,60±0,20	105,00±5,00	16,00±0,80	124,00±1,00
оксалат	4,70±0,20	18,00±0,50	3,00±0,20	32,00±1,00
цитрат	1,40±0,06	40,00±2,00	1,50±0,05	18,00±0,50
ксилоза	1,50±0,06	0	1,40±0,05	0
ксилан	12,00±0,60	30,00±1,00	1,40±0,05	0

В таблице 4 представлены биотехнологические характеристики роста и продукции экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055.

Таблица 4 – Влияние температуры и состава среды на рост и продукцию экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055

Условия	Абсолютно сухая биомасса клеток (АСБ), г/л	Сухой ЭПС, г/л	Выход ЭПС / АСБ	Выход ЭПС / субстрат
МС, 25 °С	0,25	0,10	0,40	0,10
МС, 31 °С	0,14	0,30	2,14	0,30
МСО, 25 °С	0,40	0,25	0,63	0,25
МСО, 31 °С	0,30	0,10	0,33	0,10

Таким образом, оптимальными условиями для продукции ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 являлись: среда МС, 31 °С, встряхивание 200 об/мин.

Влияние условий культивирования на рост и продукцию экзополисахаридов *A. abiegnus* Z-0056

Бактерии *A. abiegnus* Z-0056 культивировали 200 ч при температуре 25°С на средах МС и МСО. На среде МС выделение ЭПС происходило с 45 до 100 часов роста культуры, а на среде МСО – с 40 до 60 ч (Рисунок 2). Продукция ЭПС была стабильна до 190 ч роста культуры на среде МС и 180 ч на среде МСО, после чего происходил ее спад.

При выращивании культуры *A. abiegnus* Z-0056 количество ЭПС на 100 часов роста составило на среде МС 0,2 ± 0,01 и 0,3 ± 0,01 г/л на среде МСО. На среде МС продукция составила 0,1 г ЭПС с 1 г клеток, на среде МСО – 0,2 г ЭПС с 1 г клеток.

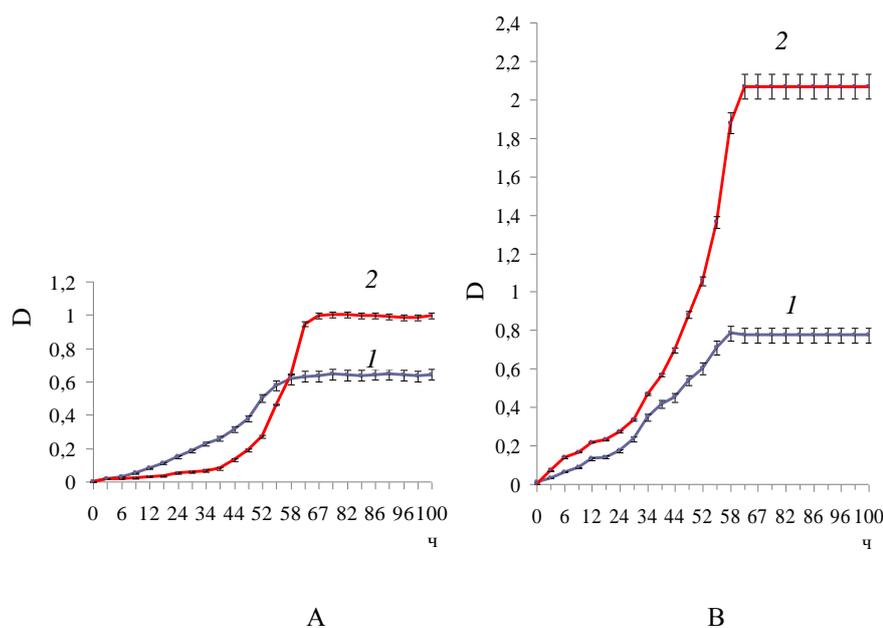


Рисунок 2 – Динамика роста и выхода ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 при 25 °С на средах МС (А) и МСО (В)

Примечание – 1 - рост ($\lambda_{425 \text{ нм}}$), 2 - выделение ЭПС ($\lambda_{490 \text{ нм}}$).

Рост культуры *A. abiegnus* Z-0056 на среде МС при добавлении различных концентраций нитрата аммония незначительно, как и в случае *X. xylophilus* Z-0055, отличался друг от друга, причем максимальным ($25,0 \cdot 10^8$ клеток/мл) он был при концентрации в среде 0,25 г/л. Наибольшую продукцию ЭПС (144 мг/л) наблюдали при этой же концентрации нитрата аммония в среде (Таблица 5). При добавлении в среду МС различных концентраций дигидрофосфата калия культура одинаково хорошо росла при 0,035; 0,07; 0,14 г/л. Однако продукция ЭПС была максимальной (160 мг/л) при концентрации 0,14 г/л дигидрофосфата в среде (Таблица 6), но не превышала продукцию ЭПС клетками в контроле (без добавления дигидрофосфата калия).

Таблица 5 – Влияние различных концентраций нитрата аммония на рост и продукцию ЭПС *A. abiegnus* Z-0056

Время, ч	NH_4NO_3 0,125 г/л		NH_4NO_3 0,25 г/л		NH_4NO_3 0,5 г/л		Контроль, без NH_4NO_3	
	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л
	$M \pm m$	$M \pm m$						
10	1,9±0,2	10,0±0,5*	1,6±0,3	16,0±0,7	2,1±0,1	12,0±0,2*	1,7±0,3	17,1±1,1
20	2,4±0,4*	17,0±0,7*	2,0±0,3*	24,0±1,2*	2,3±0,3*	20,0±0,4*	6,5±0,5	75,0±0,8
50	14,6±0,3*	41,0±1,2*	23,0±0,2*	78,0±1,7*	11,5±0,4	47,0±1,4*	11,5±0,2	95,3±2,8
100	21,2±0,4*	72,0±1,4*	25,0±0,6*	140,0±1,5*	19,3±0,5*	76,0±1,1*	12,7±0,4	154,4±4,3

Примечание – $p < 0,05$ * - относительно контроля.

При температуре 31 °С выделение культурой ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 на двух средах продолжалось с 25 ч до 45 ч, после чего происходил спад продукции ЭПС. Наибольшее количество ЭПС было $0,030 \pm 0,001$ г/л культуральной жидкости на средах МС и МСО. На обеих средах продукция составила 0,1 г ЭПС с 1 г клеток. Было проведено выяснение влияния аэрации на рост *A. abiegnus* Z-0056, продукцию клетками ЭПС без встряхивания, при 100 и 200 об/мин. Максимальная продукция ЭПС была получена при выращивании клеток культур с аэрацией при встряхивании со скоростью 200 об/мин на среде МСО.

Таблица 6 – Влияние различных концентраций дигидрофосфата калия на рост и продукцию ЭПС *A. abiegnus* Z-0056

Время, ч	КН ₂ РО ₄ 0,035 г/л		КН ₂ РО ₄ 0,07 г/л		КН ₂ РО ₄ 0,14 г/л		Контроль, без КН ₂ РО ₄	
	Количество клеток ×10 ⁹ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток ×10 ⁹ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток ×10 ⁸ кл./мл	Количество ЭПС мг/л	Количество клеток ×10 ⁸ кл./мл	Количество ЭПС мг/л
	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m
10	1,3±0,3*	8,0±0,6*	1,4±0,1*	11,0±0,3*	1,5±0,1*	17,0±1,0	1,7±0,3	17,1±1,1
20	1,4±0,2*	17,0±0,4*	1,5±0,4*	24,0±0,4*	1,5±0,4*	17,9±1,2*	6,5±0,5	75,0±0,8
50	7,4±0,7*	26,0±1,3*	8,8±0,2*	41,0±1,5	2,0±0,7*	85,0±1,1*	11,5±0,2	95,3±2,8
100	12,6±0,5	31,0±1,8*	13,0±0,6	70,0±1,8*	17,0±0,4*	160,0±1,4	12,7±0,4	154,4±4,3

Примечание – p<0,05* - относительно контроля.

При культивировании *A. abiegnus* Z-0056 на средах с различными источниками углерода в качестве субстрата было замечено, что наилучший рост был на средах с ксилозой (3,0 г/л) и сукцинатом (1,0 и 3,0 г/л) (Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние источников углерода в различных концентрациях на рост и продукцию ЭПС *A.abiegnus* Z-0056

Источник углерода	Концентрация источника углерода 1,0 г/л		Концентрация источника углерода 3,0 г/л	
	Количество клеток ×10 ⁸ кл./мл	Количество ЭПС г/л	Количество клеток ×10 ⁸ кл./мл	Количество ЭПС мг/мл
	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m
сукцинат	13,80±0,70	118,00±5,90	15,40±0,80	66,00±3,30
оксалат	3,50±0,20*	14,00±0,70*	3,60±0,20*	14,00±0,70*
цитрат	9,50±0,50*	56,00±2,80*	2,10±0,10*	14,00±0,70*
ксилоза	13,50±0,70*	0,6±0,03*	17,00±0,80*	0
ксилан	3,60±0,20*	0,5±0,02*	2,00±0,10*	0,08±0,01*

Однако, как и в случае *X. xylophilus* Z-0055, добавление в среду МС дополнительных источников азота и фосфора стимулирует рост клеток культуры *A. abiegnus* Z-0056, при этом снижается продукция ЭПС с клетки.

В таблице 8 представлены биотехнологические характеристики роста и продукции экзополисахарида *A. abiegnus* Z-0056.

Таблица 8 – Влияние температуры и состава среды на рост и продукцию ЭПС *A. abiegnus* Z-0056

Условия	Абсолютно сухая биомасса клеток (АСБ), г/л	Сухой ЭПС, г/л	Выход ЭПС / АСБ	Выход ЭПС / субстрат
МС, 25 °С	0,29	0,20	0,70	0,20
МС, 31 °С	0,27	0,03	0,11	0,03
МСО, 25 °С	0,38	0,30	0,80	0,30
МСО, 31 °С	0,27	0,03	0,11	0,03

Таким образом, оптимальными условиями для продукции ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 является среда МСО, 25 °С, встряхивание 200 об/мин, содержание в среде нитрата аммония 0,25 г/л и дигидрофосфата калия 0,14 г/л.

Выделение и очистка экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056

Для выделения ЭПС, продуцируемых *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056, культуры выращивали на средах МС и МСО соответственно исходя из условий подобранных нами выше. Выделение и очистку экзополисахаридов проводили по методу (Cerning, Roissart, Luquet, 1986) в нашей модификации. Для этого культуральную жидкость сначала упаривали на ротаторном испарителе, после чего центрифугировали при 10000 g и осаждали 3 объемами 96% этанола, отстаивали в течение 12 ч при температуре 4 °С. Затем центрифугировали при 2500 g, суспендировали полученный осадок в 96% этаноле, центрифугировали при 2500 g, высушивали на воздухе. После чего растворяли осадок в дистиллированной воде, центрифугировали при 2500 g, осадок повторно растворяли в дистиллированной воде, осаждали 3 объемами этанола, после чего полученный ЭПС растворяли в воде и лиофильно высушивали. Следует отметить, что для выделения ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 бактериальную взвесь после упаривания на ротаторном испарителе предварительно неоднократно пропускали через шприц с диаметром иглы 0,06 мм. Это связано с тем, что ЭПС данной культуры локализуется вокруг клетки в виде слизи, а клетка окружена многочисленными фимбриями (Зайчикова, Берестовская, Акимов и др., 2010), которые и затрудняют выделение биополимера.

Полученные ЭПС представляли собой порошки белого цвета, не имеющие запаха, не содержащие белка, нуклеиновых кислот и клеток продуцента. Экзополisahариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 были условно названы нами ксилофилян и анцилан соответственно.

Физико-химические свойства экзополисахарида *X. xylophilus* Z-0055

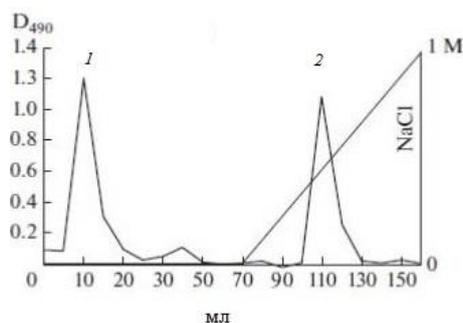


Рисунок 3 – Ионообменная хроматография экзополисахарида *X. xylophilus* Z-0055 на колонке с характеристиками: l=15 см, d=1,5 см; наполнитель - DEAE - Toyopearl 650(M) (Япония)

Примечание – 1 - нейтральная фракция, 2 - кислая фракция.

По данным ионообменной хроматографии ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 состоял из двух фракций: кислой и нейтральной примерно в равном соотношении (Рисунок 3). Молекулярная масса нейтральной фракции ЭПС составила 10-20 кДа, кислой – 30-40 кДа.

Методом ТСХ было показано, что в состав ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 входят глюкоза, галактоза, манноза и глюкуроновая кислота. Для уточнения моносахаридного состава были проведены ВЭЖХ и ГЖХ.

Анализ моносахаридного состава нейтральной фракции методом ВЭЖХ показал наличие в её составе глюкозы, галактозы и маннозы в соотношении 1:2:2. Анализ кислой фракции проводили методом ГЖХ. Было показано, что в состав кислой фракции входят ксилоза, галактоза и глюкуроновая кислота в соотношении 2:1:1. Динамическая вязкость 1% раствора ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 при +25 °С составила 58 мПа·с.

Физико-химические свойства экзополисахарида

A. abiegnus Z-0056

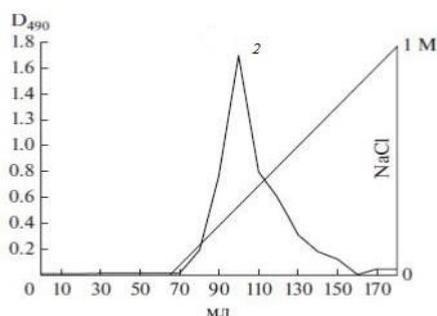


Рисунок 4 – Ионообменная хроматография экзополисахарида *A. abiegnus* Z-0056 на колонке с характеристиками: $l=15$ см, $d=1,5$ см; наполнитель - DEAE - Тоуорепарл 650 (M) (Япония)
Примечание – 2 - кислая фракция.

По результатам ионообменной хроматографии, ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 состоял из кислой фракции (Рисунок 4). Молекулярная масса ЭПС *A. abiegnus* Z-0056, определяемая методом гель-хроматографии, составила 10-15 кДа.

Анализ моносахаридного состава ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 методом ТСХ показал наличие в нем глюкозы, маннозы и галактуроновой кислоты. Для уточнения моносахаридного состава был использован метод ВЭЖХ в модификации для одновременного определения кислых и нейтральных сахаров (Meyer, Fischer, Kuzyakov *et al.*, 2008; Zhang, Khan, Nunez *et al.*, 2012).

Методом ВЭЖХ обнаружено, что исследуемый ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 имеет в составе глюкозу, маннозу, галактуроновую кислоту в соотношении 1:2:2, а также следовые количества галактозы, арабинозы и фукозы. Динамическая вязкость 1% раствора ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 при +25 °C составила 52 мПа·с.

Влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на микроорганизмы

Определение влияния ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на микроорганизмы производили методом диффузии в агар и методом серийных разведений в концентрациях 0,25; 0,5; 1,0 г/л (Лабинская, Волина, 2010). Для этого использовали тест-культуры (*B. cereus* 8035, *P. aeruginosa* 27533, *E. coli* 01, *S. aureus* 209-P, *C. albicans* 230) и бактерии сходного местообитания (*S. mucilaginosa* Z-0071, *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056).

Экзополисахарид *X. xylophilus* Z-0055 в концентрациях 0,25; 0,5 г/л и 1,0 г/л усиливал рост бактерий *P. aeruginosa* 27533 в 2, 5, 7 раз соответственно, а на рост таких микроорганизмов как *E. coli* 01, *S. aureus* 209-P, *B. cereus* 8035, *C. albicans* 230 в таких же концентрациях влияния не оказывал. Аналогичные результаты были получены и в отношении ЭПС *A. abiegnus* Z-0056.

В результате исследования было показано, что добавление ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 в концентрации 1,0 г/л усиливало рост бактерий сходных местообитаний *S. mucilaginosa* Z-0071, *A. abiegnus* Z-0056 и рост своего продуцента *X. xylophilus* Z-0055, в то время как в концентрациях 0,25 и 0,5 г/л такого эффекта не наблюдали. Добавление ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 в концентрации 1 г/л усиливало рост лишь *S. mucilaginosa* Z-0071 и своего продуцента, на рост *X. xylophilus* Z-0055 биополимер влияния не оказывал; в концентрациях же 0,25 г/л и 0,5 г/л данный ЭПС не оказывал влияния на рост перечисленных бактерий.

Исходя из приведенных данных, можно предположить, что ЭПС бактерий-диссипотрофов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в микробном сообществе могут быть использованы некоторыми бактериями как источник углерода.

Влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на инфузории

Изучение токсичности ЭПС проводили на инфузориях *C. stenii* согласно ГОСТ

13496.7 – 97. Было показано, что при добавлении ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 в концентрации 1,0 г/л в культуру инфузорий через 3-5 минут происходило их хаотичное движение. Начиная с десятой минуты, наблюдали остановку отдельных клеток. Через 30 минут наступала гибель 100 % инфузорий. Через 50 минут в поле зрения наблюдали только фрагменты клеток. При добавлении ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 в культуру инфузорий через 3 минуты происходило также их хаотичное движение, как и в случае ЭПС *X. xylophilus* Z-0055, а начиная с пятой минуты наблюдали замедление движения отдельных клеток. Через 10 минут в поле зрения появлялись неподвижные клетки. Через 30 минут наступала гибель 100 % инфузорий, а через 50 минут в поле зрения наблюдали только фрагменты клеток. Клетки инфузорий, помещенные в физиологический раствор (контроль), двигались спокойно и оставались живыми в течение всего эксперимента (3 часа).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что экзополисахариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в концентрации 1,0 г/л токсичны для инфузорий. Изучаемые полисахариды показали уникальную активность в отношении простейших. Ранее были проведены исследования влияния ряда других бактериальных экзополисахаридов на инфузорию колподоы в тех же условиях и концентрациях (Рысмухамбетова, 2009; Правдивцева, 2012), однако ни один из изученных ЭПС гибели простейших не вызывал. Это свойство дает возможность рассматривать их в перспективе в качестве компонента противопротозойных средств.

Влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на организм мышей

Изучение токсичности экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 проводили на белых беспородных мышах согласно ГОСТ 13496.7 – 97. Животные были разделены на контрольную и опытные группы. Контрольная группа получала физиологический раствор (0,85 % NaCl) в объеме 1 мл. Опытным группам животных вводили растворы ЭПС (ксилофилян и анцилан) в объеме 1 мл в дозах 0,06 г/кг и 3,0 г/кг. Растворы ЭПС и физиологический раствор вводили в организм мышей *per os* через катетер натошак. Наблюдения за животными проводили в течение 3 суток. По окончании периода наблюдений у всех животных контрольной и опытных групп собирали кровь из хвостовой вены для общего и биохимического анализа крови и мочу для общего анализа, после чего мышей подвергали эвтаназии, производили вскрытие и определение морфометрических характеристик внутренних органов. В ходе эксперимента осуществляли контроль динамики массы тела животных, по результатам которого не было выявлено существенных различий между опытными и контрольной группами животных. Это свидетельствовало о том, что на данном временном отрезке пероральное введение экзополисахаридов в организм животных не отражалось на их росте.

В контрольной группе на протяжении 3 суток после введения раствора ЭПС мыши были активны, поведение соответствовало норме. Признаки интоксикации отсутствовали. Во всех опытных группах, получавших ксилофилян и анцилан, поведение животных в ходе эксперимента было угнетенным в течение 2 суток, затем постепенно приходило в норму, но иногда проявлялись признаки агрессии.

Было проведено визуальное изучение, а также сравнительное исследование гистологических срезов печени, почек и сердца животных контрольной и опытных групп. Согласно полученным результатам, внешний вид, размеры и состояние тканей внутренних органов мышей контрольной группы соответствовали показателям клинически здоровых животных.

При вскрытии животных, получавших исследуемые ЭПС в дозе 3,0 г/кг, визуально наблюдали увеличение размера печени и ее неравномерную окраску по сравнению с контролем. Тканевый материал печени, полученный от группы мышей, получавших анцилан в высокой дозе, имел более бледную и неоднородную окраску по сравнению с контролем, клетки органа были более крупные.

Внешний вид почек у животных опытных групп был не изменен по сравнению с контролем, однако в тканевом материале, взятом от животных, получавших ксилофиан и анцилан в дозе 3,0 г/кг, в цитоплазме клеток были видны разных размеров вакуоли, наполненные жидкостью.

Внешний вид сердца во всех опытных группах не был изменен по сравнению с контролем. На гистологических срезах сердца мышей, получавших анцилан в высокой дозе, наблюдали поверхностную дезорганизацию соединительной ткани (мукоидное набухание). Описанные изменения были слабо выражены у животных, получавших тот же препарат в низкой дозе.

Влияние исследуемых ЭПС на органы мышей были подтверждены анализами крови и мочи. Неоднородную окраску печени у мышей, получавших ксилофиан можно связать с разрушением эритроцитов, об этом говорит факт снижения времени лизиса эритроцитов у животных опытных групп (Проскуракова, Сметанина, Бухарова, 2015). На это указывает и тромбоцитопения (Таблица 9), появление билирубина в крови и моче, уробелиногена в моче у опытных животных, получавших исследуемые ЭПС (Таблица 10, 11). У мышей, получавших анцилан в указанных дозах, наблюдали повышение уровня холестерина в крови, которое сопровождалось уменьшением уровня щелочной фосфатазы (Таблица 10). Это говорит о нарушении функции печени. По данным эксперимента, во всех опытных группах происходило повышение общего содержания белка в крови и моче, что свидетельствует об обезвоживании организма животных (Таблица 10,11). В пользу этого говорит и то, что в крови исследуемых мышей наблюдалась гипернатриемия (Таблица 10). Также у мышей, получавших ксилофиан, повышался уровень креатинина, что в свою очередь свидетельствует о нарушениях функции печени и почек. Все описанные изменения можно связать с возможной способностью ЭПС связывать воду.

Таблица 9 – Влияние ксилофиана и анцилана на гематологические показатели крови мышей

Характер воздействия	Показатели крови мышей							
	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, %	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Гранулоциты, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	
Контроль	8,0±0,6	126,0±4,1	7,1±0,4	12,4±1,8	82,6±3,1	5,0±0,6	538±14,2	
Ксилофиан, г/кг	0,06	7,6±0,7	123,0±2,4	7,6±0,6	10,0±2,1	88,0±3,5	2,0±0,1*	453±13,7*
	3,00	7,9±0,6	121,0±3,0	8,5±0,4*	7,4±1,4	91,5±7,1	1,1±0,1**	307±12,1**
Анцилан, г/кг	0,06	7,8±0,5	121,0±3,7	8,4±0,5*	13,1±2,1	82,6±4,7	4,3±0,4*	342±12,9*
	3,00	7,6±0,4	114,0±2,6*	8,6±0,7*	13,7±2,4	82,5±3,6	3,8±0,5*	210±13,1**

Примечание – p<0,05* - относительно контроля; ** - относительно дозы 0,06 г/кг.

Таблица 10 – Влияние ксилофиана и анцилана на некоторые биохимические показатели крови мышей

Характер воздействия	Показатели крови						
	Белок общ., г/л	Билирубин общ., ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	Щелочная фосфатаза, ед/л	Натрий, ммоль/л	Креатинин, ммоль/л	
Контроль	56,2±1,4	4,3±0,3	2,4±0,4	103,5±4,4	107,2±5,2	91,6±4,4	
Ксилофиан, г/кг	0,06	59,6±0,5	5,2±0,4*	2,2±0,3	93,3±3,4	149,3±5,7*	110,1±5,6
	3,00	64,3±0,7*	6,1±0,3*	2,1±0,4	91,6±4,3	151,2±6,5*	120,4±6,5*
Анцилан, г/кг	0,06	83,6±3,7*	6,6±0,4*	4,8±0,4*	73,3±3,6*	148,3±4,4*	54,8±2,8*
	3,00	84,1±2,8*	6,9±0,3*	5,1±0,4*	71,6±2,6*	161,2±5,7*	55,1±3,7*

Примечание – p<0,05* - относительно контроля.

Таблица 11 – Влияние ксилофила и анцилана на физико-химические и биохимические показатели мочи мышей

Характер воздействия		Относительная плотность	pH	Белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л	Уробелиноген, мкмоль/л	Билирубин, мкмоль/л
Контроль		1,01± 0,02	5,50	-	-	17,00	-
Ксилофила, г/ кг	0,06	1,03± 0,04	5,00	1,00± 0,01	-	33,00*	100,00
	3,0	1,03± 0,04	5,00	1,00 ± 0,04	-	33,00*	100,00
Анцилан, г/кг	0,06	1,03± 0,04	5,00	1,00 ± 0,03	2,80	66,00*	100,00
	3,0	1,03± 0,04	5,50	3,00± 0,10	2,80	66,00*	100,00

Примечание – $p < 0,05$ * - относительно контроля.

Таким образом, результаты наблюдений и гистологических исследований внутренних органов лабораторных мышей, получавших изучаемые ЭПС перорально, показывают различное влияние на показатели крови и на основные показатели белкового, углеводного, липидного, азотистого, водно-солевого обменов в организме мышей. Причем, в малых дозах это влияние менее выражено.

Влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на микрофлору толстого кишечника мышей

Известно, что ЭПС бактерий способны оказывать влияние на микрофлору толстого кишечника животных (Правдивцева, Горельникова, Абросимова и др., 2009; Нурмухамедов, Правдивцева, Фокина и др., 2010). В связи с этим интересно было исследовать влияние ЭПС бактерий-диссипотрофов (*X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056) на микрофлору кишечника мышей.

Изучение микрофлоры толстого кишечника проводили на самцах белых беспородных мышей. ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в концентрации 0,06 г/кг и 3,0 г/кг вводили по 1 мл на животное перорально с помощью зонда. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в том же объеме. Через 3 суток после введения ЭПС животных умерщвляли, производили забор содержимого толстого кишечника и проводили посев содержимого на чашки Петри со средами для подсчета общего микробного числа (ОМЧ) бактерий (среда КМАФАнМ) и для молочнокислых бактерий (лактобакагар). Посевы культивировали в термостате при 37 °С в течение трех суток. Далее производили подсчет колоний и определяли морфологические признаки выросших бактерий. Количество бактерий определяли методом серийных разведений (Лабинская, Волина, 2010). Показано, что при введении ксилофила в дозировке 0,06 г/кг в организм мышей ОМЧ уменьшалось в 3,5 раза, а количество молочнокислых бактерий возрастало в 4 раза по сравнению с контролем. В дозировке ксилофила 3,0 г/кг ОМЧ в толстом кишечнике мышей уменьшалось незначительно (в 0,9 раз), в то же время количество молочнокислых бактерий возрастало в 40 раз. При введении анцилана в концентрации 0,06 г/кг происходило уменьшение ОМЧ в 3,5 раза по сравнению с контролем и увеличение числа молочнокислых бактерий в 5 раз. При концентрации анцилана 3,0 г/кг наблюдали как увеличение ОМЧ, так и увеличение количества молочнокислых бактерий в 1,1 раз и 80 раз соответственно по сравнению с контролем.

Таким образом, пероральное введение в организм мышей ксилофила и анцилана способствует увеличению количества молочнокислых бактерий. Полученные данные хорошо согласуются с результатами других исследователей (Правдивцева, Горельникова, Абросимова и др.; 2009; Нурмухамедов, Правдивцева, Фокина и др., 2010; Денисова, Рысмукхамбетова, Бухарова и др., 2013), согласно которым, бактериальные ЭПС

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* В-1596, *L. delbrueckii* В-1936, *Xanthomonas campestris* В 610/1 также увеличивали количество молочнокислых бактерий в толстом кишечнике мышей.

Заключение

В результате проведенных исследований были выделены и охарактеризованы ЭПС *X. xylophilus* Z-0055, *A. abiegnus* Z-0056. Было показано, что существенное влияние на продукцию ЭПС оказывают состав питательной среды, температура, pH, время культивирования. Оптимальными условиями для продукции ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 (ксилофила) являлись: среда МС, 31 °С, встряхивание 200 об/мин; для *A. abiegnus* Z-0056 (анцилана) – среда МСО, 25 °С, встряхивание 200 об/мин, содержание в среде нитрата аммония 0,25 г/л и дигидрофосфата калия 0,14 г/л. Ксилофила состоит из двух фракций: кислой и нейтральной примерно в равном соотношении с молекулярной массой 10-20 кДа и 30-40 кДа. Нейтральная фракция состоит из глюкозы, галактозы и маннозы, кислая фракция – ксилозы, галактозы и глюкуроновой кислоты. Анцилан представлен кислой фракцией с молекулярной массой 10-15 кДа, состоящей из глюкозы, маннозы, галактуроновой кислоты. Динамическая вязкость 1% раствора ксилофила и анцилана при +25 °С составляет 58 мПа·с и 52 мПа·с соответственно. Изучено влияние ЭПС на бактерии, грибы, инфузории и лабораторных животных (мышей). Оба ЭПС усиливали рост бактерий и обладали противопаразитарной активностью. Выявлено, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055, *A. abiegnus* Z-0056 оказывают в разной степени влияние на все метаболические процессы у мышей. В результате исследования влияния ЭПС на микрофлору толстого кишечника мышей было обнаружено, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 увеличивают количество молочнокислых бактерий. Полученные результаты по изучению свойств экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 открывают перспективы их применения в медико-биологической и ветеринарной практике.

Выводы

1. Впервые обнаружена способность *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 к продукции ЭПС; подобраны оптимальные условия культивирования (среда МС, 31 °С, pH=5,5; 100 ч – *X. xylophilus* Z-0055 и среда МСО, 25 °С, pH=5,5; 100 ч – *A. abiegnus* Z-0056) для обеспечения максимального продуцирования ими экзополисахаридов в лабораторных условиях.

2. Впервые выделены, очищены и охарактеризованы экзополисахариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056. Установлено, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 представлен нейтральной и кислой фракциями в равном соотношении с молекулярными массами 10-20 кДа и 30-40 кДа соответственно и с разным моносахаридным составом: нейтральная фракция состоит из глюкозы, галактозы и маннозы в соотношении 1:2:2; кислая фракция – из ксилозы, галактозы и глюкуроновой кислоты в соотношении 2:1:1; 1% раствор ЭПС при +25 °С обладает динамической вязкостью 58 мПа·с. ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 представлен кислой фракцией, обладает молекулярной массой 10-20 кДа и состоит из глюкозы, маннозы, галактуроновой кислоты в соотношении 1:2:2; 1% раствор ЭПС при +25 °С обладает динамической вязкостью 52 мПа·с.

3. Показано, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 оказывают положительное влияние на рост бактерий их естественного местообитания в концентрации 1,0 г/л и на *P.aeruginosa* 27533 в концентрациях 0,25 г/л; 0,5 г/л; 1,0 г/л.

4. Обнаружено, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в концентрации 1,0 г/л оказывают токсичное действие на инфузории *C. stenii*.

5. Показано, что в дозах 0,06 г/кг и 3,0 г/кг ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 оказывают различное влияние на основные показатели белкового, углеводного, липидного, азотистого, водно-солевого обмена в организме мышей.

6. Установлено, что введение per os ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 способствует увеличению количества молочнокислых бактерий в толстом кишечнике экспериментальных животных (мышей) в дозе 0,06 г/кг в 4 и 5 раз, а в дозе 3,0 г/кг – в 40 и 80 раз соответственно.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Кичемазова, Н.В. Влияние условий культивирования *Ancylobacter abiegnus* на продукцию экзополисахаридов / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Ю.Ю. Берестовская, Л.В. Васильева, Л.В. Карпунина // Известия Саратовского Университета. Новая серия. Химия. Биология. Экология. – 2012. – Т. 12, Вып. 3. – С. 71-76.

2. Бухарова, Е.Н. Исследование биологических свойств экзополисахарида *Xanthobacter xylophilus* / Е.Н. Бухарова, Н.В. Кичемазова, И.А. Бухарова, И.В. Суровцова, Л.В. Карпунина // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2013. – № 2. – С. 11-14.

3. Бухарова, Е.Н. Закономерности продукции экзополисахарида *Xanthobacter xylophilus* и его химическое строение / Е.Н. Бухарова, Н.В. Кичемазова, И.А. Бухарова, Л.В. Карпунина // Научное обозрение. – 2014. – № 6. – С. 10-17.

4. Кичемазова, Н.В. Биологические свойства экзополисахарида *Ancylobacter abiegnus* / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, И.В. Суровцова, Л.В. Карпунина // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9, Ч. 1. – С. 75-81.

5. Кичемазова, Н.В. Получение, свойства и сферы возможного применения экзополисахаридов бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter* / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Н.Ю. Селиванов, И.А. Бухарова, Л.В. Карпунина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т 53, № 3. – С. 285–290.

Публикации в сборниках и материалах конференций

1. Кичемазова, Н.В. Экзополисахариды бактерий-диссипотрофов / Н.В. Кичемазова, Д.А. Жемеричкин, Е.Н. Бухарова, Ю.Ю. Берестовская, Л.В. Васильева, Л.В. Карпунина // Химия и биохимия углеводов: материалы IV Всероссийской школы-конференции. IV Всероссийской школы - конф. – Саратов, 2011. – С. 60-61.

2. Ени, Г.Т. Влияние условий внешней среды на продукцию экзополисахарида *Ancylobacter abiegnus* / Г.Т. Ени, Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Л.В. Карпунина // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V Всероссийской (с межд. участием) студ. науч. конф. – Ульяновск, 2012. – Ч. I. – С. 22-25.

3. Шипулина, О.С. Подбор оптимальных условий культивирования для продукции экзополисахарида бактериями *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 / О.С. Шипулина, Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Л.В. Карпунина // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V Всероссийской (с межд. участием) студ. науч. конф. – Ульяновск, 2012. – Ч. I. – С. 137-139.

4. Кичемазова, Н.В. Влияние условий внешней среды на продукцию экзополисахаридов бактерий-диссипотрофов / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Ю.Ю. Берестовская, Л.В. Карпунина // Аграрная наука в XXI веке: проблемы и перспективы: материалы VI Всероссийской науч.- практ. конф. – Саратов, 2012. – Ч. II. – С. 61-62.

5. Ени, Г.Т. Влияние источников углерода на продукцию экзополисахарида анцилобактеров / Г.Т. Ени, Н.В. Кичемазова // Студенчество в науке – инновационный потенциал будущего: сб. науч. статей V Всероссийской науч.- практ. конф. – Набережные Челны, 2012. – С. 192.

6. Кичемазова, Н.В. Влияние источников углерода, азота и фосфора на синтез экзополисахаридов бактерий-диссипотрофов/ Н.В. Кичемазова // Исследования молодых ученых в биологии и экологии: сб. науч. тр.– Саратов, 2012. – Вып. 10. – С. 46-50.

7. Бухарова, И.А. Продукция экзополисахарида культурой *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и его характеристика / И.А. Бухарова, Н.В. Кичемазова // Исследования молодых ученых в биологии и экологии: сб. науч. тр. – Саратов, 2012.– Вып. 10 – С. 7-10.

8. Кичемазова, Н.В. Биологические свойства экзополисахарида *Xanthobacter xylophilus* / Н.В. Кичемазова, И.А. Бухарова, Е.Н. Бухарова, И.В. Суровцова, Л.В. Карпунина //Биотехнология реальность и перспективы в сельском хозяйстве: материалы межд. науч.- практ. конф. – Саратов, 2013.– С. 195.

9. Кичемазова, Н.В. Изучение химического состава и физико-химических свойств экзополисахарида *Ancylobacter abiegnus* / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Л.В. Карпунина // Биология - наука 21 века: сб. тез. межд. Пушинской школы-конф. молодых уч. – Пушкино, 2014.– С. 212.

10. Кичемазова, Н.В. Получение и характеристика экзополисахаридов бактерий-диссипотрофов / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Л.В. Карпунина //Фундаментальная гликобиология: материалы II Всероссийской школы - конф. – Саратов, 2014. – С. 72.

11. Кичемазова, Е.Н. Влияние экзополисахаридов бактерий-диссипотрофов на организм мышей / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, И.В. Суровцова, М.Д. Сметанина, Л.В. Карпунина // Биотехнология: реальность и перспективы: материалы межд. науч.- практ. конф. – Саратов, 2014. – С.135-138.

12. Кичемазова, Н.В. Экзополисаариды бактерий-диссипотрофов и возможности их применения / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Л.В. Карпунина // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: материалы науч.-практ. конф. / под ред. А.В. Молчанова, В.В. Строгова. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2018. – С. 142-146.

Патенты

1. Кичемазова Н.В., Карпунина Л.В., Бухарова Е.Н. Способ получения экзополисахарида бактерий *Ancylobacter abiegnus* // Патент РФ 2662979. Зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ 31. 07. 2018, Бюл. № 22.

2. Кичемазова Н.В., Карпунина Л.В., Бухарова Е.Н., Бухарова И.А. Способ получения экзополисахарида бактерий *Xanthobacter xylophilus* // Патент 2664198. Зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ 15.08.2018, Бюл. №23.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю доктору биологических наук, профессору Карпуниной Лидии Владимировне за помощь на всех этапах выполнения диссертации; сотрудникам Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН д.б.н. Л.В. Васильевой и к.б.н. Ю.Ю. Берестовской за предоставление культур бактерий; к.б.н., с.н.с. ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов) Селиванову Н.Ю. за практическую помощь при определении углеводного состава экзополисахаридов; к.в.н. ООО Научно-инновационная компания «Викдог» (г. Саратов) Суровцовой И.В. и к.б.н., доц. Сметаниной М.Д. ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (г. Саратов) за консультации и большую помощь в экспериментах с животными. Выражаю искреннюю признательность и благодарность к.б.н., доценту Бухаровой Екатерине Николаевне за консультации и совместную работу.

КИЧЕМАЗОВА Наталья Валентиновна

**ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ
РОДОВ *XANTHOBACTER* И *ANCYLOBACTER*: ХАРАКТЕРИСТИКА
И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Подписано в печать Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 120 экз. Заказ

Набор компьютерный.

Отпечатано в