Д.Р. Абдулина, Л.М. Пуриш, Г.А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, Украина, 03143

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СУЛЬФИДОГЕННОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО ТРАНСКОНЬЮГАНТЫ С ПЛАЗМИДАМИ RP4 И R68.45

Цель работы. Определить влияние внехромосомных генетических элементов (плазмид) на морфологические и коррозионные свойства сульфидогенных микробных ассоциаций при формировании ими биоплёнок на поверхности стали. **Методы.** Микробиологические, молекулярно-биологические. **Результаты.** Наличие плазмид RP4 и R68.45 у бактерий-компонентов сульфидогенного сообщества изменяло морфотип колоний: отмечено появление S-, O-типа колоний у бактерий-трансконьюгантов в отличие от R-типа исходных штаммов. Выявлены изменения в физиологической и коррозионной активности бактерий-трансконьюгантов и сульфидогенных сообществ. При формировании биоплёнки на поверхности стали сульфидогенной ассоциацией в составе: *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36 и трансконьюганта *Pseudomonas aeruginosa* 27(R68.45) по сравнению с исходной ассоциацией, не содержащей плазмид, снижалось накопление белка в биоплёнке в 2,3-4,4 раза, продуцирование сероводорода – в 1,5 раза, уменьшалась скорость коррозии в 2 раза. **Выводы.** Изучение влияния внехромосомных генетических элементов на функционирование биоплёнки, образованной сульфидогенным сообществом, является перспективным для обоснования новых подходов к предупреждению возникновения коррозии и разработке альтернативных биологических средств противокоррозионной защиты металлов.

Ключевые слова: сульфидогенное микробное сообщество, трансконьюганты, коррозионная активность.

В природных условиях оптимальной формой жизнедеятельности сульфидогенного микробного сообщества является биоплёнка, как правило, формирующаяся на поверхности металла и в дальнейшем становящаяся одним из факторов его микробной коррозии [3, 20]. Формирование биоплёнок часто сопровождается изменениями морфолого-физиологических свойств бактерий [17]. Изменения в микробной ассоциации могут происходить в результате обмена информацией между участниками посредством ряда сигнальных молекул или генетическим путем по разнообразным механизмам [5, 7, 21]. Тесный контакт бактерий в биоплёнке создает условия для обмена генетической информацией посредством конъюгации [9]. Внесение новой генетической информации в микробное сообщество косвенно или прямо способствует проявлению или приобретению бактериями новых свойств [2, 4].

Ранее нами была показана возможность переноса плазмид в бактерии-компоненты сульфидогенного микробного сообщества [1]. Однако, наличие, распространение и возможность обмена генетической информацией с помощью плазмид между бактериями в сульфидогенном сообществе остаются мало изученными.

Ввиду того, что коррозионные процессы на поверхности металла протекают в биоплёнке, целью нашей работы было определение влияния плазмид на морфологические и коррозионные свойства бактерий – компонентов сульфидогенных ассоциаций при формировании ими биоплёнок на поверхности стали.

Материалы и методы. Объекты исследования. В работе использовали бактерии *Desulfovibrio* sp. 10 (УКМ В-11503) и их ассоциативные спутники *Pseudomonas aeruginosa* 27 (УКМ В-11507), *P. mendocina* 29 (УКМ В-11509), *Aeromonas hydrophila/caviae* 30 (УКМ В-11510), *Bacillus subtilis* 36 (УКМ В-11513), выделенные и идентифицированные нами ранее из коррозионно-агрессивного сульфидогенного микробного сообщества [3, 19]. В ходе работы [1] проведено трансконъюгационное скрещивание коллекционных штаммов бактерий с *E.coli* J53, несущими трансмиссионные плазмиды RP4, R68.45 и получены трансконъюганты: *P. aeruginosa* 27(RP4), *P. aeruginosa* 27(R68.45), *P. mendocina* 29(RP4), *P. mendocina* 29(R68.45), *A. hydrophila/caviae* 30(RP4), *A. hydrophila/caviae* 30(R68.45). Установлена степень стабильности наследования плазмиды R68.45 для штаммов *P. mendocina* 29 – 49%, *P. aeruginosa* 27 – 90%, *A. hydrophila/caviae* 30 – 100%, для плазмиды RP4 – *P. aeruginosa* 27 – 51% и *A. hydrophila/caviae* 30 – 100% [1].

Штаммы бактерий хранятся в коллекции отдела общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины.

Коррозионно-агрессивные сульфидогенные ассоциации. В модельных опытах использовали искусственно созданные трехкомпонентные сульфидогенные микробные ассоциации, состоящие из исходных штаммов бактерий в соотношении 1:1:1 (*Desulfovibrio* sp. 10, *P. aeruginosa* 27, *B. subtilis* 36) и ассоциации с трансконъюгантным штаммом (*Desulfovibrio* sp. 10, *P. aeruginosa* 27(R68.45), *B. subtilis* 36). Предварительные исследования показали, что в исходной ассоциации штаммы бактерий не содержали плазмид [1].

Культивирование бактерий. Ассоциативные спутники сульфатредуцирующих бактерий культивировали в течение 24-36 ч в жидкой среде LB при температуре 28°C до выхода в позднюю фазу стационарного роста [14]. Трансконъюгантные штаммы культивировали при температуре 28°C на агаризованной среде LB с тетрациклином (40 мкг/мл) в течение 3 суток [1].

Сульфидогенные микробные сообщества, а также исходные *P. aeruginosa* 27 и трансконъюгантные бактерии *P. aeruginosa* 27(R68.45), выращивали в микроаэрофильных условиях в жидкой питательной среде Постгейта «В» в течении 7-10 суток при температуре 28°C до выхода в стационарную фазу роста [18].

Морфологию колоний трансконъюгантов бактерий изучали на стереомикроскопе марки Nikon SMZ 1000 (Япония) при увеличении в 20-80 раз.

Формирование биоплёнок исследовали в модельных опытах с искусственно созданными сульфидогенными ассоциациями. Опыты проводили во флаконах объёмом 50 мл, заполненных жидкой питательной средой Постгейта «В», инокулированной в зависимости от варианта опыта куль-

турами бактерий и ассоциациями в экспоненциальной фазе роста. Инокулят составлял 10% от общего объема среды, начальный титр культур – 10^7 кл/мл. Во флаконы погружали подвешенные на леске образцы стали-3 размером 4,8х1,5х0,5 см, предварительно взвешенные и обработанные по методике, описанной в [10, 19]. Флаконы герметически закрывали резиновыми пробками и инкубировали при 28°C. После 10, 16 и 32 суток экспозиции соответствующие флаконы изымали из опыта. Образцы стали извлекали из культуральной среды и погружали в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0). Биоплёнку снимали с образцов ультразвуком при 22 кГц (30с), обработку проводили трижды с интервалом 30 с на приборе УЗДН-2Т, как указано в методике [19]. Полученную суспензию центрифугировали при 8000 g (ротатор 5415R, Eppendorf), в течение 30 мин для отделения клеток. В осажденных клетках биоплёнки определяли количество белка по общепринятому методу Лоури [12].

Определение накопление сероводорода проводили в культуральной жидкости методом йодометрического титрования [13].

Скорость коррозии стали под действием сульфидогенных микробных ассоциаций и культур бактерий определяли по уменьшению массы образца стали по сравнению с исходной на единицу площади в единицу времени [19].

Результаты. Развивающиеся в условиях подземной среды сульфидогенные микробные сообщества, в основном, состоят из бактерий, проявляющих коррозионную агрессивность [3, 19, 20]. Такие сообщества являются многокомпонентными и мало изученными объектами с точки зрения молекулярной генетики. Ранее нами была обнаружена внехромосомная ДНК у бактерий-компонентов природного сульфидогенного сообщества: аммонифицирующих и железовосстанавливающих. Обнаруженные внехромосомные элементы были небольших размеров (5-9 т.п.н.). Учитывая их малые размеры, было высказано предположение, что эти элементы скорее всего являются криптическими плазмидами [1].

У полученных нами трансконъюгантов бактерий-компонентов сульфидогенного сообщества [1] мы сочли целесообразным определить, как влияет наличие трансконъюгационных плазмид на морфологические и коррозионные свойства изучаемых бактерий. Проведены сравнительные исследования форм колоний, образованных плазмидосодержащими и бесплазмидными штаммами бактерий (Рис. 1).

При культивировании на агаризованной среде LB исходные штаммы бактерий *P. aeruginosa* 27 и *A. hydrophila/caviae* 30 образовывали шершавые, матовые колонии R-типа, а штамм *P. mendocina* 29 – гладкие, блестящие колонии S-типа.

Наличие плазмиды RP4 практически не изменяло морфотип колоний *P. aeruginosa* 27, а трансконъюгант *A. hydrophila/caviae* 30(RP4) образовывал переходные колонии О-типа. Трансконъюганты бактерий, содержащие плазмиду R68.45 образовывали гладкие, блестящие колонии S-типа. Колонии плазмидосодержащего штамма *P. mendocina* 29(R68.45) не отличались от таковых, образованных исходным штаммом (данные не указаны на рис.).

Следовательно, морфология колоний, образованных трансконъюгантами бактерий, содержащими плазмиды RP4 и R68.45, отличалась от

Рис. 1. Морфология колоний исходных и трансконъюгантных штаммов бактерий, увеличение x 20-80 раз.

бесплазмидных аналогов. Возможно, именно наличие плазмид приводило к вышеуказанным морфологическим изменениям колоний.

Известно, что наличие плазмид в клетках бактерий может определенным образом влиять на формирование ими биоплёнки [6, 9, 15]. Учитывая, что процесс микробной коррозии протекает именно в биоплёнке, нами изучена возможность влияния плазмид на метаболическую и коррозионную активность бактерий, развивающихся на поверхности стали. Исследования проводили с трансконъюгантным штаммом *P. aeruginosa* 27(R68.45), имеющим наиболее высокую частоту переноса плазмид по сравнению с другими штаммами. Стабильность удержания плазмиды *P. aeruginosa* 27(R68.45) составляла 90% [1].

Показано, что исходный штамм *P. aeruginosa* 27 развивался в биоплёнке активнее трансконъюганта *P. aeruginosa* 27(R68.45). После 10-и суток культивирования накопление белка исходным штаммом *P. aeruginosa* 27 было в 3 раза выше по сравнению с трансконъюгантом (Рис. 2). Напротив, после 16-ти и 32-х суток культивирования количество белка, синтезированное штаммом, несущим плазмиду R68.45, было выше, чем у исходного на 44 и 35% соответственно.

Присутствие трансконъюганта в составе сульфидогенной коррозионно-агрессивной ассоциации влияло на активность образования биоплёнки. Исходная ассоциация бактерий на 10-е сутки культивирования продуцировала в 2,3 раза больше белка по сравнению с ассоциацией, содержащей трансконъюгант: *Desulfovibrio* sp. 10+ *P. aeruginosa* 27(R68.45) + *B. subtilis* 36 (Рис. 26). По завершению срока экспозиции накопление белка ассоциацией с трансконъюгантом было меньше в 4,4 раза, т.е. внесение

Рис. 2. Продуцирование белка в биоплёнке монокультурами (а) и сульфидогенными микробными ассоциациями (б).

P. aeruginosa 27(R68.45) в состав ассоциации приводило к понижению образования биоплёнки.

Одним из важных показателей метаболической и коррозионной активности сульфидогенного сообщества является накопление сероводорода. Установлено, что штаммы, как исходный *P. aeruginosa* 27, так и трансконъюгированный *P. aeruginosa* 27 (R68.45) продуцировали в небольших количествах сероводород (Рис. 3).

В течение всего срока экспозиции штамм *P. aeruginosa* 27(R68.45), несущий плазмиду, продуцировал на 6,25-20,0% меньше сероводорода

Рис. 3. Продуцирование сероводорода монокультурами (а) и сульфидогенными ассоциациями бактерий (б).

Рис. 4. Скорость коррозии стали Ст3 в присутствии монокультур (а) и сульфидогенных ассоциаций бактерий (б).

по сравнению с исходным штаммом (Рис. 3а). Сульфидогенная ассоциация бактерий, содержащая трансконъюгант *P. aeruginosa* 27(R68.45), аналогично, продуцировала почти в 1,5 раза меньше сероводорода (до 226 мг/л), сравнительно с исходной (360 мг/л).

Выявлены изменения коррозионной активности исходного штамма и его трансконъюганта, а также микробных ассоциаций, в составе которых был трансконъюгант *P. aeruginosa* 27(R68.45) (Рис. 4). Сравнительные исследования монокультур псевдомонад показали, что в присутствии трансконъюганта *P. aeruginosa* 27(R68.45) на 16-е сутки экспозиции скорость коррозии стальных образцов была в 2,8 раза ниже, чем под воздействием исходного штамма *P. aeruginosa* (Рис. 4а), а по завершению экспозиции скорость коррозии стали под действием трансконъюганта возрастала на 18,5%, однако данные были статистически недостоверные.

Ассоциация бактерий *Desulfovibrio* sp. 10 + *P. aeruginosa* 27 + *B. subtilis* 36 проявляла высокую скорость коррозии в течение всего срока экспозиции (Рис. 4б). Например, после 16-ти суток экспозиции скорость коррозии составляла 0,487 $\text{г/ч}\cdot\text{см}^2$, что в 2,9 раза больше по сравнению с ассоциацией с трансконъюгантом (0,167 $\text{г/ч}\cdot\text{см}^2$). Наличие трансконъюганта *P. aeruginosa* 27(R68.45) в ассоциации приводило к существенному замедлению коррозионных процессов на металле в 1,9-2,9 раза в течение всего периода экспозиции.

Обсуждение. Таким образом, внесение чужеродной плазмидной ДНК в бактерии-компоненты сульфидогенного коррозионно-агрессивного сообщества привело к изменению морфологии колоний – к появлению S- и О-типов. Это возможно объяснить проявлением плеiotропного эффекта, то есть множественным действием генетического материала плазмид на несколько фенотипических признаков, в том числе и на морфологию колоний.

Согласно немногочисленным данным, бактерии, содержащие плазмиды, а также мутантные штаммы *Streptococcus gordonii*, интродуцированные транспозонами Tn916, теряли способность образовывать

биоплёнки [11]. С другой стороны, есть сведения, что внедрение конъюгативных F-плазмид способствовало формированию мощной био­плёнки клетками *E. coli* K12 благодаря появлению поверхностных структур – пилей [6]. В то же время установлено, что био­плёнки штамма *B. subtilis*, несущего плазмиду 2335/pBMB105, образуются и развиваются быстрее, но начинают распадаться позже, чем пленки исходного штамма [15].

Другим объяснением может быть тот факт, что проявление диссоциации вида колоний связано с «био­плёночным» и «планктонным» фенотипом [5, 16]. Автором [16] показано, что после ресуспендирования зрелых сформированных био­плёнок *P. aeruginosa* и высева их на питательную среду образовывались колонии различных морфотипов, R- и S-типов, при этом бактерии R-типа лучше формировали био­плёнки. Можем предположить, что внесение плазмид в клетки влечет за собой определённые изменения в экспрессии генов или адаптационных процессах.

Особое внимание следует обратить на то, что в условиях био­плёнки ассоциативная культура бактерий, содержащая трансконъюгант *P. aeruginosa* 27(R68.45), снижала метаболическую активность и коррозионную агрессивность, о чем свидетельствует уменьшение продуцирования сероводорода в 1,5 раза; накопления белка – в 2,3-4,4 раза и снижение скорости коррозии стали в 1,9-2,9 раза.

Поскольку основным коррозионным агентом в сульфидогенном сообществе являются сульфатредуцирующие бактерии, не исключено, что на уровне сообщества проявлялся не только плейотропный эффект, но и межвидовые взаимодействия, повлиявшие на формирование био­плёнки.

По нашему мнению, одной из причин таких изменений является появление трансконъюгантов с S-типом колоний. Известно, что бактерии такого типа не способны формировать устойчивую био­плёнку на поверхностях, потому происходит замедление процессов, связанных с функционированием био­плёнки [8, 9]. В нашем случае при нарушении процесса формирования био­плёнки сульфидогенным микробным сообществом падает накопление белка и уменьшается скорость коррозии стали.

Таким образом, дальнейшее изучение функционирования био­плёнки, образованной сульфидогенным сообществом, и данные о влиянии генетических факторов на её жизнедеятельность могут быть использованы для обоснования принципиально новых подходов к предупреждению возникновения коррозионных явлений на поверхности стали и разработке альтернативных биологических средств противокоррозионной защиты металлов.

Авторы выражают благодарность д.б.н., член-корреспонденту НАН Украины, заведующему отделом молекулярной генетики бактериофагов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины Товкачу Ф.И. за предоставление плазмид и оказание технической и консультативной помощи в проведении работы.

Д.Р. Абдуліна, Л.М. Пуріш, Г.О. Іутинська

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, Україна, 03143*

**ФУНКЦІОНУВАННЯ СУЛЬФІДОГЕННОГО МІКРОБНОГО
УГРУПОВАННЯ, ЩО МІСТИТЬ ТРАНСКОН'ЮГАНТИ
ІЗ ПЛАЗМІДАМИ RP4 ТА R68.45**

Резюме

Мета роботи. Визначення впливу позахромосомних генетичних елементів (плазмід) на морфологічні та корозійні властивості сульфідогенних мікробних асоціацій за формування ними біоплівки на поверхні сталі. **Методи.** Мікробіологічні, молекулярно-біологічні. **Результати.** Наявність плазмід RP4 та R68.45 у бактеріях-компонентах сульфідогенного угруповання призводило до зміни морфотипу їх колоній: відмічено появу S-, O-типів колоній у бактерій-транскон'югантів на відміну від R-типу диких штамів. Виявлено зміни у фізіологічних та корозійних властивостях бактерій-транскон'югантів та сульфідогенних угруповань. За формування біоплівки на поверхні сталі сульфідогенною асоціацією такого складу: *Desulfovibrio sp. 10*, *Bacillus subtilis 36* та транскон'юганта *P. aeruginosa 27(R68.45)* знижувалось накопичення білка у біоплівці у 2,3-4,4 рази, продукування сірководню – в 1,5 рази та зменшувалась швидкість корозії сталі у 2 рази, порівняно із вихідною асоціацією, що не містила плазмід. **Висновки.** Вивчення впливу позахромосомних елементів на функціонування біоплівки, утвореної сульфідогенним угрупованням є перспективним для обґрунтування нових підходів до попередження виникнення корозії і розробці альтернативних біологічних засобів протикорозійного захисту металів.

Ключові слова: сульфідогенне мікробне угруповання, транскон'юганти, корозійна активність.

D.R. Abdulina, L.M. Purish, G.O. Iutynska

*Zabolotny Institute of microbiology and virology NAS of Ukraine,
Zabolotny str, 154, Kyiv, Ukraine, 03143*

**FUNCTIONING OF SULFIDOGENIC MICROBIAL COMMUNITY,
INCLUDING TRANSCOJUGANTS WITH
THE RP4 AND R68.45 PLASMIDS**

Summary

Aim of the study is to evaluate the influence of the extrachromosomal genetic elements (i.e. plasmids) on the morphological and corrosion features of the sulfidogenic microbial communities during the biofilm formation on steel surface. **Methods.** Microbiological, molecular biological. **Results.** Bacteria from sulfidogenic microbial community harboring RP4 and R68.45 plasmids changed their colony morphotype: the transconjugated bacteria formed the colonies of the S-, O-types instead the R-type colonies of the wild strains. The changes in the physiological and corrosive activity of the transconjugated bacteria and sulfidogenic communities were demonstrated. Under the biofilm formation on the steel surface by the sulfidogenic microbial community including *Desulfovibrio sp. 10*, *Bacillus subtilis 36* and transconjugated strain *Pseudomonas aeruginosa 27(R68.45)* the protein

synthesis in the biofilm was decreased in 2,3-4,4 times, the hydrogen sulfide production – 1,5 times and corrosion rate inhibition – 2 times in comparison with non-plasmid harboring community. **Conclusions.** The study of the influence of the extrachromosomal genetic elements during biofilm formation by the sulfidogenic microbial community may help to create new approaches for corrosion prevention and develop alternative biologically based anticorrosion measures for metals corrosion protection.

Keywords: sulfidogenic microbial community, transconjugants, corrosive activity.

1. Abdulina DR, Purish LM, Iutynska GA. [Possibility of the plasmid transfer within bacteria – compounds of the sulfidogenic microbial community]. Mikrobiol. Zh. 2013; 75(4): 23-29. Russian.
2. Akhmetov LI, Filonov AE, Puntus IF, Kosheleva IA, Nechaeva IA et al. Horizontal transfer of catabolic plasmids in the process of naphthalene biodegradation in model soil systems. Microbiology (Mikrobiologiya). 2008; 77(1): 23-32.
3. Asaulenko LG, Purish LM Abdulina DR. [Taxonomic position of certain representatives of sulfidogenic corrosive microbial community]. Mikrobiol. Zh. 2010. 72(4): 3-10. Ukrainian.
4. Christensen BB., Sternberg C, Andersen JB, Eberl L, Moller S et al. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64(6): 2247-2255.
5. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 2000; 64(4): 847-867.
6. Ghigo J-M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature. 2001; 412: 442-445.
7. Haagensen JA, Hansen SK, Johansen T. In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. FEMS Microbiol. Ecol. 2002; 42(2): 261-268.
8. Hansen S, Rainey PB, Haagensen J, Molin S. Evolution of species in a biofilm community. Nature. 2007; 445(1): 533-536.
9. Hausner M, Wuerz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65: 3710-3713.
10. Korrosiya: manual. ed by. Shraer LL. Moscow: Metallurgiya, 1981. 632 p. Russian.
11. Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: Identification of genes that code for biofilm phenotypes. J. Bacteriol. 2000; 182(5): 1374-1382.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journ. Biol. Chem. 1951; 193(1): 265-275.
13. Lur'ie YY [Unificirovannye metody analiza vod] Moscow: Khimiya; 1971. 194 p. Russian
14. Maniatis T., Fritsch EE, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. translated in rus. ed. by A.A Baev, K.G. Skryabin. Moscow: Mir, 1984. 480 p. Russian.
15. Mogil'naya OA, Krylova TYu, Popova LYu. The morphological characteristics and the dynamics of biofilms formed by a transgenic *Bacillus subtilis* strain. Microbiology (Mikrobiologiya). 2003; 72(4): 509-510.
16. Parsek MR Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface associated microbial life. J. Bacteriol. 2004; 186(14): 4427-4440.

17. Plakunov VK, Strelkova EA, Zhurina MV. Persistence and adaptive mutagenesis in biofilms. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2010; 79(4): 424-434.
18. Postgate JR. The sulphate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 1984. 208 p.
19. Purish LM, Asaulenko LG, Abdulina DR, Vasyliiev VN, Iutynska GA. Role of polymeric complexes in the formation of biofilms by corrosive bacteria on steel surface. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012; 48(3): 262-269.
20. Purish LM, Asaulenko LG. Dynamics of successive changes in sulphidogenic microbial association under the conditions of formation of the biofilm on steel surface. *Mikrobiol. Zhurn.* 2007; 69(6): 19-25. Ukrainian.
21. Thomas CM, Nielsen K. Mechanisms of and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3(9): 711-721.

Отримано 29.08.2016