

А.В.Осин, Н.С.Червякова, Т.В.Валова

## ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ШТАММОВ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА СУБЛИМАЦИОННЫХ УСТАНОВКАХ РАЗНОГО ТИПА И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПОЛУЧЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Цель работы.** Оценка возможности применения различных сублимационных установок для лиофилизации патогенных микроорганизмов бактериальной природы и сравнительный анализ качества, полученных с их помощью препаратов коллекционных штаммов. **Материалы и методы.** В качестве контрольных использовали четыре штамма патогенных микроорганизмов, относящихся к разным видам и используемых в качестве тестовых при проверке качества питательных сред в диагностической деятельности. Их лиофилизацию осуществляли на четырех различных сублимационных аппаратах коллекторного и камерного типов. Качество полученных препаратов лиофилизированных штаммов определяли путем установления жизнеспособности их клеток, а также с помощью ускоренного теста прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур бактерий (тест термостабильности). **Результаты и выводы.** Подобраны условия лиофилизации коллекционных тест-штаммов патогенных бактерий III–IV групп патогенности с помощью коллекторных аппаратов нового поколения Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry. Проведен сравнительный анализ показателей жизнеспособности, выживаемости и прогнозируемых сроков хранения, полученных на них препаратов штаммов патогенных микроорганизмов с таковыми, лиофилизированными на аппарате системы К.Е.Долинова и программируемой сушилки камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6D. Установлено, что препараты микроорганизмов, высушенных на различных сублимационных установках, характеризуются высокой жизнеспособностью содержащихся в них бактериальных клеток и прогнозируемым сроком хранения от 4 до 105 лет, в зависимости от вида микроорганизма и типа лиофильной сушилки.

**Ключевые слова:** коллекционные штаммы, лиофилизация, выживаемость, тест термостабильности.

Корреспондирующий автор: Осин Александр Владимирович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.V.Osin, N.S.Chervyakova, T.V.Valova

## Lyophilization of Pathogenic Microorganisms Strains on Freeze-Drying Modules of Different Type, and Quality Assessment of the Preparations Obtained

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Objective** of the study is to evaluate applicability of different freeze-driers for lyophilization of pathogenic microorganisms of bacterial origin, and to perform comparative analysis of the quality of the strain formulations obtained using these devices. **Materials and methods.** Four strains of pathogenic microorganisms, belonging to different species and applied as test ones for quality assessment of nutrient media, have been utilized as controls. Their lyophilization has been conducted on four different modules for sublimation, collector- and chamber-type. The quality of lyophilized strain formulations obtained has been evaluated via determination of their cell viability, as well as with the help of rapid survivability test on lyophilized bacterial cultures (thermo-stability assay). **Results and conclusions.** Specified are the conditions for lyophilization of collection test-strains of pathogenic bacteria, falling under the category of the III–IV groups of hazard, using collector devices of the new generation, Martin Christ Alpha 1-4 LDplus and Heto Power Dry. Carried out has been comparative analysis of viability, survivability and prognosticated terms of storage for the strain preparations obtained with the help of the mentioned above modules and the like, lyophilized on the instrument based on K.E. Dolin technology and programmable drier of the chamber type, Martin Christ Epsilon 2-6D. It is revealed that microorganism preparation lyophilized on different sublimation devices are characterized with high viability of the contained bacterial cells and have prognosticated storage terms of 4–105 years, depending upon the microorganism species and the type of freeze-drier utilized.

**Key words:** collection strains, lyophilization, survivability, thermo-stability test.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Aleksander V. Osin, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Citation:** Osin A.V., Chervyakova N.S., Valova T.V. Lyophilization of Pathogenic Microorganisms Strains on Freeze-Drying Modules of Different Type, and Quality Assessment of the Preparations Obtained. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:66–70. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-66-70

Наиболее важными задачами, стоящими перед государственными коллекциями патогенных бактерий, являются поддержание коллекционных штаммов в жизнеспособном состоянии с сохранением их первоначальных свойств в течение максимально возможного времени, а также обеспечение ими научно-исследовательских, образовательных, медицинских

и производственных учреждений. Для решения этих задач используют различные методы долгосрочной консервации штаммов [3].

Одним из наиболее часто используемых методов консервации патогенных микроорганизмов является лиофилизация [2, 8]. Клетки лиофилизированных бактериальных штаммов способны длительное вре-

мя сохраняться в жизнеспособном состоянии при температуре 4 °С, не утрачивая своих первоначальных свойств [1, 4, 6], что значительно упрощает деятельность по поддержанию коллекционного фонда патогенных микроорганизмов, а также легко позволяет транспортировать их в любой регион Российской Федерации.

В настоящее время единственной официально регламентированной лиофильной сушкой, предназначенной для высушивания штаммов I–IV групп патогенности, является коллекторный аппарат системы К.Е.Долинова, сильно устаревший как физически, так и морально. Однако в плане обеспечения биологической безопасности процесса лиофилизации патогенных микроорганизмов он превосходит современные установки, поскольку может полностью обрабатываться любыми дезинфекционными средствами, а также подвергаться процедуре автоклавирования, в связи с чем на данный момент является практически безальтернативным вариантом для сушки возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы и других бактерий I–II групп патогенности. Вместе с тем в продаже имеется широкий выбор современных лиофильных сушек, которые могли бы быть использованы для консервации коллекционных штаммов, относящихся к III–IV группам патогенности.

Таким образом, целью нашего исследования являлась оценка возможности применения различных сублимационных установок для лиофилизации патогенных микроорганизмов и сравнительный анализ качества, полученных с их помощью препаратов коллекционных штаммов.

### Материалы и методы

В качестве модели нами выбраны четыре штамма из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора: *Vibrio cholerae* non O1 P-9741, *Shigella flexneri* 8516, *Escherichia coli* 18 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209–P), использующиеся в качестве тестовых при проверке качества питательных сред в диагностической деятельности.

Микроорганизмы культивировали при 37 °С в течение 16–18 ч на агаре Хоттингера с разным pH среды: для холерного вибриона – 7,6, возбудителя дизентерии – 7,4, штаммов кишечной палочки и стафилококка – 7,2.

Накопление бактериальной массы перед лиофилизацией осуществляли путем посева отобранных на плотной питательной среде 20–30 типичных по морфологии колоний на соответствующую среду (75 мл), скошенную во флаконах, и выращивали до ранней стационарной фазы.

По окончании времени инкубации бактериальную массу смывали 2–2,5 мл соответствующей среды высушивания. При этом конечная концентрация ПБА в смыве составляла не менее  $n \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл. В качестве среды высушивания для *V. cholerae* приме-

няли лактозо-желатиновую среду, состоящую из 15 % лактозы и 3 % желатины, а для остальных микроорганизмов использовали сахарозо-желатиновую среду (среда Файбича), состоящую из 10 % сахарозы, 1,5 % желатины и 0,1 % агара (pH 7,1–7,2). Лيوфилизацию штаммов на аппаратах коллекторного типа (аппарат системы К.Е.Долинова, Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry) проводили в ампулах ШПВ-1, в объеме 0,2 мл при глубине вакуума не менее 0,04–0,05 мбар в течение 7 ч; камерного типа (Martin Christ Epsilon 2-6D) – во флаконах стандарта 2R, в объеме 0,5 мл в автоматическом режиме по следующей программе: I – охлаждение препарата до температуры минус 45 °С при атмосферном давлении (1000 мбар) в течение 1 ч; II – начальная лиофилизация при температуре минус 45 °С при давлении 0,18 мбар в течение 1 ч; III – последующая лиофилизация при давлении 0,18 мбар с постепенным повышением (шаг в 3 °С) температуры до плюс 20 °С в течение 1 ч; IV – заключительная лиофилизация при давлении 0,18 мбар и температуре 20 °С в течение 1 ч; V и VI – досушивание при температуре 20 °С и давлении 0,001 мбар в течение 1 ч и при температуре 30 °С и давлении 0,001 мбар в течение 2 ч соответственно.

Жизнеспособность микробов определяли путем высева их на питательные среды с последующим подсчетом клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100 %.

Для определения возможного времени хранения при 4 °С использовали ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур бактерий (тест термостабильности) [5, 9].

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы проведена оценка жизнеспособности клеток лиофилизируемых штаммов до и после процесса высушивания. На основе этих данных рассчитан показатель их выживаемости. Полученные результаты свидетельствуют о различиях в концентрации выживших клеток как в зависимости от сублимационной установки, так и от вида микроорганизма (табл. 1).

Концентрация жизнеспособных клеток штамма *V. cholerae* non O1 P-9741 после лиофилизации падает практически на порядок. Показатели выживаемости у клеток этого штамма самые низкие в ряду использованных в исследовании культур и колеблются в интервале 12,6–36,0 %, в зависимости от используемой лиофильной установки. Это связано в первую очередь с высокой чувствительностью вибрионов к стрессовым условиям процедуры сублимации [4, 10]. Необходимо отметить, что при сушке в лиофильной камере показатель выживаемости клеток холерного вибриона составил 36 %, что более чем в два раза превышает таковой у препаратов, полученных на коллекторных аппаратах (табл. 1). Что же касается

Таблица 1

Количество жизнеспособных клеток и показатель их выживаемости у коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, лиофилизированных на различных сублимационных установках

Штамм	Количество жизнеспособных клеток (lg м.к./мл) и показатель выживаемости (%)											
	Аппарат К.Е.Долинова			Martin Christ Alpha 1-4D			Heto Power Dry			Martin Christ Epsilon 2-6D		
	До сушки*	После сушки**	%***	До сушки	После сушки	%	До сушки	После сушки	%	До сушки	После сушки	%
<i>V. cholerae</i> non O1 P-9741	10,31	9,41	12,6	10,29	9,47	14,9	9,94	9,17	16,7	10,32	9,88	36,0
<i>S. flexneri</i> 8516	10,2	10,17	77,9	10,52	10,39	75,0	9,59	9,53	86,4	10,08	9,91	68,0
<i>E. coli</i> 18	10,39	10,22	67,7	10,01	9,82	65,0	10,23	10,1	74,6	10,06	9,87	65,0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10,90	10,89	97,0	11,38	11,25	74,2	10,12	10,1	94,6	10,97	10,83	73,0

\* Исходная концентрация клеток микроорганизма до лиофилизации, выраженная в lg от количества микробных клеток в 1 мл.

\*\* Концентрация клеток микроорганизма в лиофилизированном образце, выраженная в lg от количества микробных клеток в 1 мл.

\*\*\* Показатель выживаемости – соотношение исходной концентрации клеток микроорганизма к таковой после лиофилизации, выраженный в процентном исчислении.

остальных микроорганизмов, то концентрация жизнеспособных клеток в их лиофилизированных образцах также снижалась, однако показатели выживаемости оставались на высоком уровне (табл. 1).

Следующий этап нашей работы был направлен на установление концентрации жизнеспособных клеток в препаратах штаммов, лиофилизированных на разных установках, в процессе их хранения. Все изучаемые культуры были помещены в холодильник и хранились при температуре 4 °C в течение 12 месяцев, по прошествии которых проведен анализ концентрации сохранившихся живых клеток микроорганизмов. Полученные данные свидетельствуют, что препараты, сублимированные на трех лиофильных сушках коллекторного типа (аппарат системы К.Е.Долинова, Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry), сохраняют максимальное количество жизнеспособных клеток после года хранения (табл. 2). Показатели выживаемости у штаммов, высушенных на этих аппаратах, находятся в интервале от 97,3 до 98,7 %, что указывает на высокое качество их образцов. В то же время жизнеспособность клеток микроорганизмов, лиофилизированных с помощью камерной сушки Martin Christ Epsilon 2-6D, различалась в зависимости от вида, а показатели их выживаемости были в целом ниже, чем у препаратов, лиофилизированных на аппаратах коллекторного типа (табл. 2). Так, после года хранения концентрация живых клеток штамма *V. cholerae* non O1 P-9741, высушенных в камерной сушке, оказалась на уровне 17,0 %, что является самым низким показателем выживаемости среди изучаемых штаммов. Следует

отметить снижение этого параметра и у *S. flexneri* 8516 с *E. coli* ATCC 18, который составил в процентном исчислении 63,0 и 73,0 % соответственно. При этом количество жизнеспособных клеток у штамма *S. aureus* ATCC 6538, высушенного на Martin Christ Epsilon 2-6D, практически не отличалось от такового при лиофилизации его на аппаратах коллекторного типа и составило 93,0 %.

На основе ускоренного теста прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур (тест термостабильности) проведена оценка возможных сроков хранения высушенных на разных сублимационных установках препаратов коллекционных штаммов при температуре 4 °C. В основу данного теста положено определение количества жизнеспособных клеток в препаратах после их инкубации при различных температурах и последующей статистической обработкой полученных данных.

Установлено, что выживаемость лиофилизированных клеток изученных нами штаммов бактерий резко падает с увеличением температуры их хранения. Изучение динамики выживаемости сублимированных культур от времени хранения при разных температурах позволило провести оценку времени снижения количества жизнеспособных бактерий в высушенных препаратах. Исходя из полученных данных, установлено, что наиболее продолжительными будут сроки хранения лиофилизированных препаратов коллекционных штаммов, полученные с помощью сублимационной установки Heto Power Dry. Так, при хранении полученных на ней высушенных образцов при температуре 4 °C количество жизнеспособных клеток снизится

Таблица 2

Количество жизнеспособных клеток коллекционных штаммов, лиофилизированных на различных установках, после их хранения при 4 °C в течение 12 месяцев

Штамм	Количество жизнеспособных клеток (lg м.к./мл) и показатель выживаемости (%)							
	Аппарат К.Е.Долинова		Martin Christ Alpha 1-4D		Heto Power Dry		Martin Christ Epsilon 2-6D	
	lg м.к./мл	%	lg м.к./мл	%	lg м.к./мл	%	lg м.к./мл	%
<i>V. cholerae</i> non O1 P-9741	9,40	97,3	9,46	98,3	9,16	98,5	9,11	17,0
<i>S. flexneri</i> 8516	10,16	98,1	10,38	98,3	9,52	98,4	9,69	63,0
<i>E. coli</i> 18	10,21	98,7	9,81	98,6	10,09	98,7	10,28	73,0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10,88	97,4	11,24	98,7	10,09	98,7	10,79	93,0

Прогнозируемые сроки хранения коллекционных штаммов, лиофилизированных на разных сублимационных установках

Штамм	Срок хранения коллекционных штаммов при 4 °С (лет)			
	Аппарат К.Е.Долинова	Martin Christ Alpha 1-4D	Heto Power Dry	Martin Christ Epsilon 2-6D
<i>V. cholera</i> non O1 P-9741	19,7	30	34	4,5
<i>S. flexneri</i> 8516	53	84	74	22,5
<i>E. coli</i> 18	66	66	70	20,7
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	46,7	78,8	105	24,2

до 1 % (достаточная концентрация микробных клеток для их культивирования и воспроизводства) у *V. cholerae* non-O1 P9741 за 34 года, *S. flexneri* 8516 – 74 года, *E. coli* – 18–70 лет, *S. aureus* ATCC 6538 (209–P) – 105 лет (табл. 3). Прогнозируемые сроки хранения коллекционных штаммов, лиофилизированных на аппарате системы К.Е.Долинова, оказались ниже и составили от 19,7 лет у *V. cholerae* non-O1 P9741 до 66 лет у *E. coli* 18. Данные по Martin Christ Alpha 1-4 LDplus были промежуточными, прогнозируемый срок хранения высушенных на нем штаммов выше, чем у аппарата К.Е.Долинова, но ниже такового у Heto Power Dry (табл. 3). Результаты прогноза по хранению препаратов, лиофилизированных с помощью камерной сушки Martin Christ Epsilon 2-6D, оказались невысоки и значительно отличались от полученных на коллекторных аппаратах (табл. 3). По полученным данным, прогнозируемый срок хранения штамма холерного вибриона P-9741 составит всего 4,5 года, а у остальных культур находится в интервале от 20,7 до 24,2 лет.

В заключение следует отметить, что приоритетом проводимых экспериментов являлось не только получение качественных препаратов коллекционных штаммов, но и обеспечение биологической безопасности этого процесса. В этой связи все показатели, представленные в работе, рассчитывались исходя из минимальных объемов высушиваемой бактериальной взвеси. Такой подход, во-первых, избавляет от необходимости работы с большими объемами культуры на этапе накопления клеточной массы, снижая тем самым риски биологической опасности, а во-вторых, позволяет провести цикл лиофилизации в пределах рабочего дня, без необходимости ночных дежурств.

Исходя из полученных показателей выживаемости и прогнозируемых сроков хранения, аппараты коллекторного типа показали лучшие результаты по сравнению с камерной сушкой, что объясняется форматом хранения полученных образцов в стеклянных ампулах, отпаиваемых под вакуумом непосредственно с коллектора. При отсутствии микротрещин в стенках ампулы разрежение в ней будет сохраняться очень долго, в то время как флаконы, используемые в камерной сушке, укупориваются резиновыми пробками, теряющими со временем эластичность и, вследствие этого, пропускающими молекулы кислорода, приводящими к окислительным процессам в лиофилизированном препарате штамма, что вызывает гибель его клеток. В связи с этим формат хранения штаммов во флаконах рекомендуется для тех куль-

тур, срок хранения которых не превышает 3–4 года [7], тогда как для длительного поддержания культур больше подходит лиофилизация в ампулах.

Таким образом, нами подобраны условия лиофилизации коллекционных тест-штаммов патогенных бактерий III–IV групп патогенности с помощью коллекторных аппаратов нового поколения Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry. Проведен сравнительный анализ показателей жизнеспособности, выживаемости и прогнозируемых сроков хранения полученных на них препаратов штаммов патогенных микроорганизмов с таковыми, лиофилизированными на аппарате системы К.Е.Долинова и программируемой сушки камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6D. Полученные данные свидетельствуют о зависимости показателей выживаемости клеток и прогнозируемых сроков хранения как от вида микроорганизма, так и от марки лиофильного аппарата, а также контейнера хранения (ампула/флакон). Вместе с тем с учетом целей применения лиофилизированных культур (пополнение коллекционного фонда, с закладкой на длительное хранение/реализацию тест-штаммов, имеющих ограниченный срок использования) проделанная работа указывает на эффективность предлагаемого подхода к лиофилизации коллекционных штаммов патогенных бактерий и перспективность его внедрения в работу коллекционных центров.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беккер М.Е., Рапопорт А.И., Калакуцкий Л.В. Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне; 1987. 240 с.
2. Матвеева Е.В. Сохранение генофонда фитопатогенных бактерий методом лиофилизации. *АГРО XXI*. 2007; 10–12:28–30.
3. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Мед. науки*. 2009; 4(12):99–121.
4. Сидякина Т.М., Кузнецова Е.В., Чумакова М.Ю. Жизнеспособность и биохимическая активность дрожжей *Saccharomyces vini* при сублимационном высушивании и криоконсервации. *Пробл. криобиол.* 1986; 1:23–8.
5. Филатова С.Н., Муравьева С.А., Фишман В.М. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Ascomyces parvullus*, основанное на методе ускоренного хранения. *Микробиология*. 1977; 46(2):318–23.
6. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е. Изучение влияния некоторых параметров процесса лиофилизации на жизнеспособность споровой культуры *Streptomyces fradiae* ВНИИГ – 25А. *Пробл. криобиол.* 2002; 2:26–9.
7. American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland): ATCC; 1980. 51 p.

8. Donev T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms. Sofia; 2001. 93 p.
9. Porther D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54:265–70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.03.002.
10. Simatos D., Blond G., Dauvois P., Sauvageot F. In: La Lyophilisation. Principes et Applications. Collection de L' A.N.R.T. Paris, France; 1974. P. 349–58.

#### References

1. Bekker M.E., Rapoport A.I., Kalakutsky L.V. [Suppression of Cell's Life-Sustaining Activity]. Riga; 1987. 240 p.
2. Matveeva E.V. [Preservation of phyto-pathogenic bacteria gene pool, using lyophilization]. *AGRO XXI*. 2007; 10–12:28–30.
3. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. [Methods of extended storage of collection microorganism cultures and development trends]. *Bulletin of Higher Educational Establishments. Povolzhsky Region. Med. Sciences*. 2009; 4(12):99–121.
4. Sidiyakina T.M., Kuznetsova E.V., Chumakova M.Yu. [Viability and biochemical activity of *Saccharomyces vini* yeasts in case of sublimation and cryo-conservation]. *Probl. Kriobiol.* 1986; 1:23–8.
5. Filatova S.N., Murav'eva S.A., Fishman V.M. [Prognostication of survivability of lyophilized *Acnomyces parvullus* spores, based on accelerated storage technique]. *Mikrobiologiya*. 1977; 46(2):318–23.
6. Tsutsaeva A.A., Anan'ina A.E. [Studies of certain lyophilization

process parameters effect on viability of spore culture *Streptomyces fradiae* VNIIG – 25 A]. *Probl. Kriobiol.* 2002; 2:26–9.

7. American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland): ATCC; 1980. 51 p.

8. Donev T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms. Sofia; 2001. 93 p.

9. Porther D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54:265–70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.03.002.

10. Simatos D., Blond G., Dauvois P., Sauvageot F. In: La Lyophilisation. Principes et Applications. Collection de L' A.N.R.T. Paris, France; 1974. P. 349–58.

#### Authors:

Osin A.V., Chervyakova N.S., Valova T.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Осин А.В., Червякова Н.С., Валова Т.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 30.10.15.