

МИНИСТЕРСТВО ПРОСВЕЩЕНИЯ УКРАИНЫ  
КИЕВСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

На правах рукописи

БААСАНЖАВЫН ДАВААЛОРЖ

*STREPTOMYCES PHAEOFACIENS* SSP. ШТАММ 51  
ПРОДУЦЕНТ НОВОГО АНТИБИОТИКА ГРУППЫ АУРЕДИОВОЙ  
КИСЛОТЫ

Специальность 03.00.07 - Микробиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертация на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Киев - 1992



549

Работа выполнена в Киевском технологическом институте пищевой промышленности на кафедре биотехнологии микробного синтеза, НИИ ИНА АМН России и институте Биотехнологии АН Монголии.

Научные руководители: кандидат биологических наук, доцент  
В.Л.Воренко  
кандидат биологических наук, ст.науч-  
ный сотрудник Г.Б.Федорова

Официальные оппоненты: член корр. АН Украины, доктор биоло-  
гических наук, профессор Б.П.Мацелых  
доктор биологических наук,  
профессор С.Н.Харченко

Ведущая организация: Киевский Государственный Университет

Защита диссертации состоится "21" октября 1992 г.  
в 10<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета Д 016.06.01  
Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного АН  
Украины по адресу: 242143, г.Киев, ул. Заболотного 154.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке КТИП.

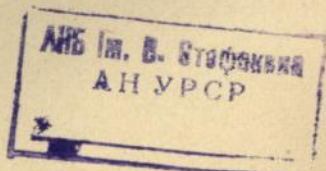
Автореферат разослан "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1992 г.

Ученый секретарь

Специализированного совета

канд. биол. наук

Э.А. Коваленко



46-25, 822

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из выдающихся достижений биологии XX века является открытие антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами. Они оказались наиболее эффективными природными соединениями, вызывавшими гибель многих патогенных бактерии, грибов и некоторых вирусов, а также широко используемыми в химиотерапии злокачественных опухолей.

Проблема изыскания новых антибиотиков как для медицинского, так и немедицинского применения в настоящее время не потерял своего значения. Большая часть используемых в медицине антибиотиков выделена из культур стрептомицетов. Возможность которых, как продуцентов - новых антибиотиков далеко не исчерпаны.

Первым шагом на пути к изысканию новых антибиотиков является выделение микроорганизмов - потенциальных продуцентов новых антибиотиков из природных мест обитания. В связи с этим культуры редких родов стрептомицетов, а также стрептомицеты малоизученных почв представляют интерес как источники новых природных соединений.

В институте Биотехнологии АН Монголии в результате исследования почвенных образцов пустыни Гоби была выделена культура стрептомицета - штамм 5I. Антибиотик продуцируемый этим стрептомицетам обладал ярко выраженным антибактериальным действием, что представляет интерес для возможного практического применения.

Цель и задачи исследования. Целью нашего исследования явилось изучение культуру стрептомицета (штамм 5I) и образуемого им антибиотического вещества.

Достижение поставленной цели в процессе исследования разрешились следующие экспериментальные задачи:

- Изучение морфологических, физиолого - биохимических и культуральных свойств штамма 5I стрептомицета ;

- Идентификация штамма 5I стрептомицета по родовой и видовой принадлежности ;

- Подбор и оптимизация компонентов питательной среды, наиболее благоприятной для биосинтеза антибиотика культурой ;

- Разработка рационального способа выделения антибиотика 5I, позволяющего наиболее полное извлечение антибиотика как из культуральной жидкости, так и из мицелия продуцента ;

- Получение основного компонента комплекса - антибиотика 5I-I и изучение его физико - химических, биологических свойств ;

- Идентификация антибиотика 5I-I и определение его места в системе классификации биологически активных веществ ;

Научная новизна. В результате проведенной работы штамм 5I стрептомицета идентифицирован как разновидность *Streptomyces phaeofaciens* ssp. . Было показано, что этот штамм образует антибиотик, по физико-химическим свойствам отнесенный к группе ауреоловой кислоты. Для культур данного вида образование антибиотика этой группы описано впервые.

Из культуры продуцента выделен антибиотик 5I, представляющий собой комплекс трех компонентов. Основным компонентом антибиотического комплекса является антибиотик 5I-I. Методом колоночной хроматографии антибиотик 5I-I получен в хроматографически чистом виде, изучены его некоторые физико-химические и биологические свойства и проведен идентификация данного антибиотика. Антибиотик 5I-I является новым представителем группы ауреоловой кислоты.

Практическая ценность. Разработанные оптимальные условия биосинтеза антибиотика культурой *Str.phaeofaciens* ssp. штамм 5I позво-

лили повысить накопление антибиотика в культуральной жидкости, что дало возможность провести исследование антибиотического вещества.

Разработан экстракционный метод выделения и очистки антибиотика, позволяющий получать препарат высокой степени чистоты.

Антибиотик 5I-I является новым представителем группы ауреоловой кислоты, что представляет несомненно не только теоритический, но и практический интерес в связи с тем, что в дальнейшем может стать новым химиотерапевтическим средством. Изучение лечебных свойств антибиотика 5I-I в опытах на животных в настоящее время продолжается.

Апробация работы. Результаты работы доложены на расширенном заседании кафедры биотехнологии микробного синтеза КТИП, на заседаниях отдела общей и почвенной микробиологии совместно с отделом антибиотиков, отделом технологии биосинтеза, отделом физиологии промышленных микроорганизмов ИМВ АН Украины.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, посвященного изучению стрептомицетов-продуцентов антибиотиков группы ауреоловой кислоты, экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 100 страницах машиннописного текста, проиллюстрированного 15 рисунками и 20 таблицами. Список литературы включает 137 наименований.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

### I. Обзор литературы

Приведена общая характеристика стрептомицетов-продуцентов антибиотиков вообще и в частности антибиотиков группы ауреоловой кислоты. Так же рассмотрены методы выделения и физико-химические, биологические свойства антибиотиков группы ауреоловой кислоты.

## 2. Изучение штамма 5I

Объект. В работе исследовали штамм 5I стрептомицета, выделенный из почвы Гоби в Монголии. Штамм 5I обладал ярко выраженным антибактериальным действием, что служило основанием для изучения микробиологических свойств и синтезируемого им антибиотика.

Морфология. Споры овальные и продолговатые, поверхность спор гладкая (рис.1). Цепочки спор спиральные (рис.2).

Хемотаксономические характеристики. Клеточная стенка содержит LL-диаминопимелиновую кислоту, т.е по классификации Лешевалье относится к I типу. Изучение состава менахинонов на масс-спектре позволило идентифицировать как МХ-9( $H_4$ ), МХ-9( $H_6$ ), МХ-9( $H_8$ )-основной компонент и МХ-9( $H_{10}$ ). Штамм 5I содержит фосфолипидов типа PI -фосфотидилэтаноламин. Содержание ГЦ пар в ДНК штамма составляет 69,57%.

Культуральные признаки приведены в таблице I.

Физиологические признаки. В качестве источников углерода штамм 5I использует глицерин, глюкозу, фруктозу, арабинозу, рамнозу, сахарозу, мальтозу, маннит и крахмал; плохо усваивает лактозу, сорбит и дульцит, не использует рафинозу, ксилозу и натриевую соль целлюлозы. В качестве неорганических источников азота использует сульфат и нитрат аммония, в качестве органических - аланин, валин, арганин, глутамин, лейцин, лизин, серин и треонин. Штамм 5I образует меланоидные пигменты на среде с пептонно-дрожжевым экстрактом и с тирозином.

Штамм 5I способен расти на среде Гаузе I с pH от 6 до 9 при температуре в интервале от 20°C до 45°C. Оптимальное значение pH и температура роста культуры составляют 7 и 28°C соответственно.

Антагонистические свойства. Штамм 5I подавляет развитие грамположительных бактерии *Bac. pasteurii* R-537, *Bac. subtilis* 6633,

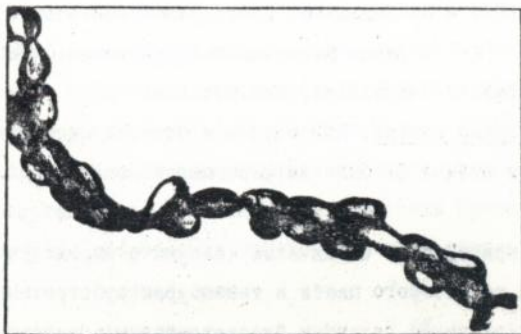


Рис. 1 Споры штамма 5I (электронная микро-  
фотография  $\times 30000$ )

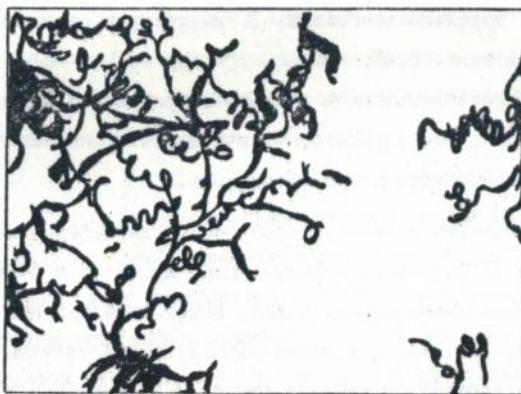


Рис. 2 Цепочки спор штамма 5I (световой  
микроскоп  $\times 1300$ )

*Staph.aureus* 209P и не подавляет рост грамотрицательных тест бактерий *Esch.coli* K-13. Штамм не проявляет фунгицидное действие в отношении *Saccharomyces cerevisiae*, *Pen.notatum*.

Популяционный анализ. При изучении естественной и индуцированной изменчивости штамма 5I было дифференцировано 3 морфологических типа колоний:

I тип - приподнятые складчатые колонии с хорошо развитым воздушным мицелием темносерого цвета и темнобурым субстратным мицелием.

II тип - колонии с развитым буровато-серым воздушным мицелием и темнобурым субстратным мицелием. Колонии приподнятые с ровными краями.

III тип - колонии, лишенные воздушного мицелия или имеющие слабо развитый воздушный мицелий и бесцветный субстратный мицелий.

Спектр и частота морфологических вариантов в естественных рассевах штамма 5I довольно стабильны. I тип колоний составляет 93,1%, II тип - 6,5% и III тип - 0,4%.

Проверка антибиотической активности различных морфологических вариантов показала, что варианты, отличающиеся от нормального типа, имели сниженную антибиотическую активность.

Морфологические и хемотаксономические характеристики показывают, что штамм 5I относится к роду *Streptomyces* и очень близок к виду *Streptomyces phaeofaciens* однако имеет определенное отличие от типового штамма. Так, типовой штамм ATCC II5034 в отличие от штамма 5I не образует растворимый пигмент на глицерин нитратном агаре. Эта характеристика не имеет таксономического значения для идентификации стрептомицетов, поэтому штамм 5I был отнесен как разновидность *Str. phaeofaciens* ssp. -штамм 5I.

Подбор и оптимизация питательных сред. В нашу задачу входил подбор и оптимизация питательных сред, наиболее благоприятных для

биосинтеза антибиотика культурой *Str. phaeofaciens* var. штамм 5I. С этой целью был использован метод математического планирования эксперимента (метод ортогональных латинских прямоугольников). Оценкой оптимизации служил уровень антибиотикообразования. Зависимость эффекта антибиотикообразования от концентрации основных компонентов комплексной среды представлена в таблице 2. На основании проведенных исследований была выбрана питательная среда следующего состава:

соевая мука	3,0%
глюкоза	2,0%
глицерин	3,0%
CaCO <sub>3</sub>	0,2%
NaCl	0,15%

Штамм 5I на этой среде наибольшее количество антибиотик накапливает на 6 сутки ферментации. Биосинтез антибиотика начинается после 12 часового роста культуры, и активность антибиотика достигает 600 ед.разведения в 1 мл культуральной жидкости в отношении *Vac. fusoides* R -537. По мере потребления субстрата в период активного антибиотикообразования pH среды возрастает с 7 до 7,6.

### 3. Выделение антибиотика и изучение его физико-химические свойства

Метод выделения антибиотика разработали в лаборатории выделения и идентификации новых антибиотиков НИИ ИНА АМН России.

Антибиотик накапливается в основном в культуральной жидкости (до 80%) и не большом количестве в мицелии продуцента, может быть выделен из обоих источников экстракционным методом.

Экстракционным метод выделения антибиотика основан на свойствах антибиотика растворяться в органических растворителях в виде свободной кислоты и в воде в виде солей. При разработке экстракцион-

Таблица I

## Культуральные признаки штамма 5I

Питательные среды	Воздушный мицелий	субстратный мицелий	растворимый пигмент	рост
минеральный агар I Гаузе	светлосерый серый	бесцветный	нет	хороший
органический агар 2 Гаузе	бесцветный	коричневатый с желтоватым оттенком	коричневатый слабый	слабый
агар Чапека с сахарозой	бесцветный	бурый	светлобу- рый	обильный
МПА	отсутствует	серый	нет	слабый
глицерин нитратный агар	беловатый серый	темнобурый грязнобурый	слабобуро- ватый	хороший
крахмально-амиачный агар	беловатый сероватый	бесцветный	нет	хороший
картофельный агар	беловатосе- рый	бесцветный	нет	умеренный
овсянный агар	серый с бе- беловатыми вкраплениями	бесцветный или буровато- желтый	нет	хороший

Таблица 2

## Зависимость эффекта антибиотикообразования от концентрации основных компонентов среды

Компоненты среды	Показатели	Варианты				
		I	II	III	IV	V
комплексная среда						
соевая мука	конц. %	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0
	эффект	-2I3	-I45	+IOI	+3I2	-55
глюкоза	конц. %	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0
	эффект	-5I	+33	+7I	-I9	-65
глицерин	конц. %	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
	эффект	-63	+23	+99	-I9	-45
NaCl	конц. %	0	0,15	0,3	0,45	0,6
	эффект	+II0	+I33	-I	-5	-I37
CaCO <sub>3</sub>	конц. %	0	0,1	0,2	0,3	0,4
	эффект	-I45	+83	+I2I	-5	-55

ного метода нам необходимо было решить ряд задач, связанных с правильностью выбора параметров выделения антибиотика. В первую очередь изучали устойчивость антибиотика к pH, поскольку выделение его происходит при значительных изменениях pH (от 2 до 10) и дальнейшую работу проводил с учетом устойчивости антибиотика.

Одним из важнейших условий эффективной экстракции является правильный выбор растворителей, который достаточно полно и избирательно извлекает бы из водной фазы интересующее нас антибиотическое вещество. Как показали наши исследования антибиотик в растворе полностью сохраняет биологическую активность при pH 1,5-10 в течение двух часов при 20°C. Было показано, что антибиотик наиболее (до 97%) полно переходит в н-бутанол. Этилацетат и бутилацетат извлекает антибиотик также достаточно полно (соответственно 93% и 95%) но более избирательно.

После проведения экстракции антибиотика из культуральной жидкости, дальнейшая очистка и концентрирование антибиотика проводилось путем перевода его из н-бутанольного экстракта в водно-щелочной раствор. Этим достигалось дальнейшее концентрирование антибиотика. Было показано, что для полной реэкстракции антибиотика необходимо, чтобы значение pH водной фазы составляло 9,8-10 так как при этом антибиотик образует натриевую соль, хорошо растворимую в воде. При pH выше 11 антибиотик инактивируется. В связи с этим процесс реэкстракции проводили при пониженной температуре (3°-5°) и быстро.

Проведение повторной экстракции этилацетатом позволял получать препараты, содержащие до 90% целевого продукта. Результаты исследования дали возможность предложить схему выделения антибиотика 5I, представленную на рисунке 3.

Характеристика антибиотика 5I. Антибиотик 5I представляет собой порошок желтого цвета хорошо растворимый в низших спиртах, ацетоне

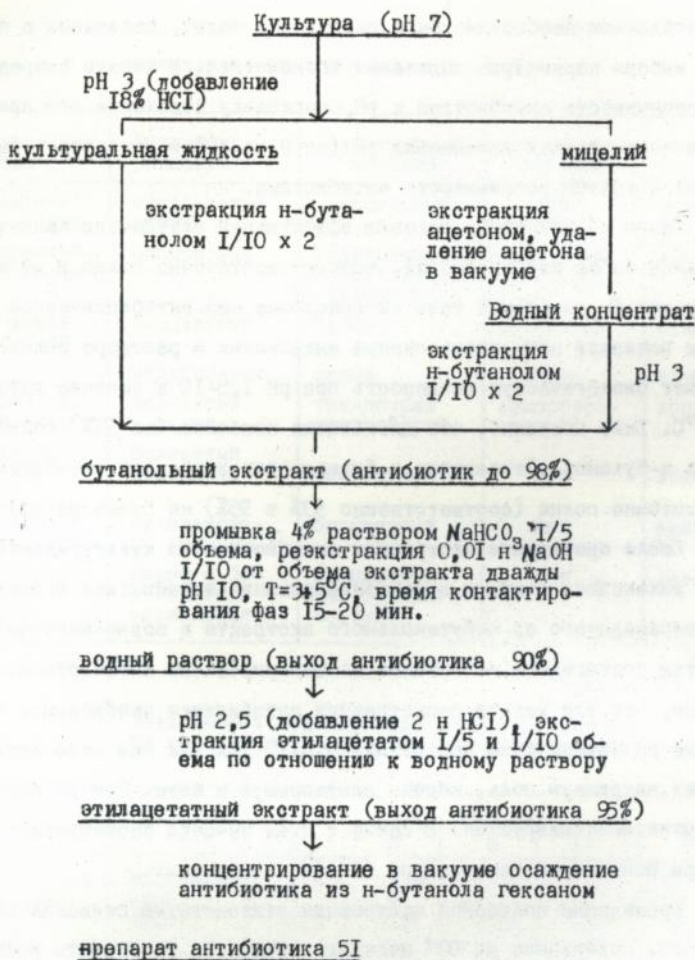


Рис. 3 Схема выделения антибиотика из культуральной жидкости и мицелия штамма 5I

этилацетат, пиридине и растворах щелочи, ограниченно растворяется в воде и практически не растворяется в хлороформе, бензоле, гексане и четырехлористом углероде. В УФ спектре антибиотик 5I имеет максимумы поглощения при  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_2\text{OH}}$  220, 229, 289, 315, 428 мкм ( $E_{1\%}^{1\text{см}}$  200, 160, 460, 68, 94 нм) (Рис. 4). По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), антибиотик 5I представляет собой, антибиотический комплекс, состоящий из трех компонентов. Основным компонентом комплекса является антибиотик 5I-I (90-95% в зависимости от условий ферментации) (Рис. 5). При анализе препарата антибиотика 5I методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинке silafol обнаруживается одно желтое пятно в различных системах растворителей соответствующее компонентам 5I-I, 5I-2 и 5I-3.

Высокоочищенный препарат антибиотика 5I-I был получен с помощью хроматографии суммарного препарата антибиотика 5I на колонках с силикагелем.

Антибиотик 5I-I. Вещество желтого цвета, температура плавления 185°C, угол вращения  $\alpha_D^{20} = +72,5$   $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_2\text{OH}}$  200, 229, 283, 315, 428 ( $E_{1\%}^{1\text{см}}$  224, 172, 509, 75, 101) (Рис. 4)

Антибиотик 5I-I дает положительную реакцию с реактивами на восстанавливающие сахара (реакция Фелинга, Толенса), фенольные и спиртовые гидроксилы (реакция с хлорным железом), а также положительную реакцию на ароматические структуры (реакция Фриделя-Крафтса).

Антибиотик 5I-I легко растворяется в низших спиртах (метаноле, этаноле, пропиноле и изопропиноле), ацетоне, этилацетате, пиридине и растворах щелочи, умеренно растворим в воде и практически не растворяется в гексане, четырехлористом углероде, хлороформе и бензоле.

В ИК спектре антибиотика 5I-I (Рис. 6) присутствуют полосы поглощения, характерные для простой эфирной ( $1050 \text{ см}^{-1}$ ), сложнэфир-

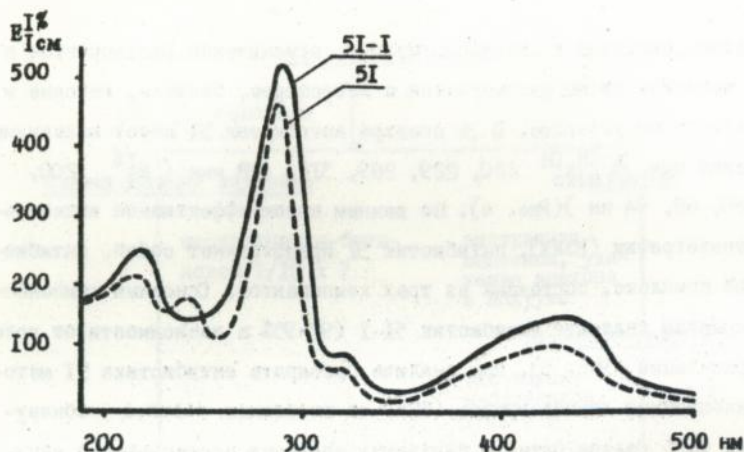


Рис. 4 УФ спектр препарат антибиотика 5I и основного компонента - антибиотика 5I-I.

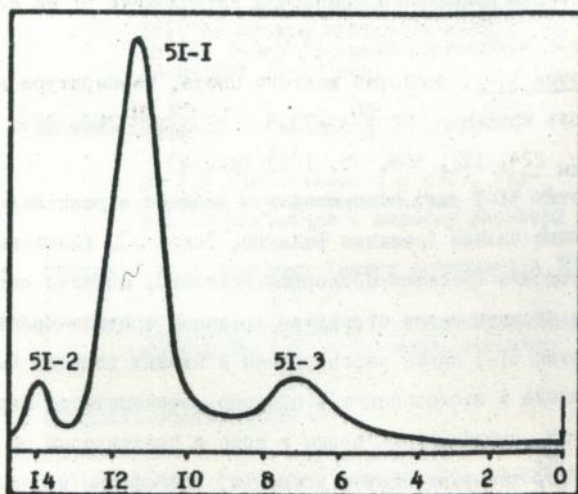


Рис. 5 ВЭЖХ препарата антибиотика 5I.  
 По оси абсцисс - время удерживания (мин.), в масштабе проводится оптическая плотность, длина волны 270 нм.  
 Элюент: ацетонитрил - фосф.буфер (36:64)

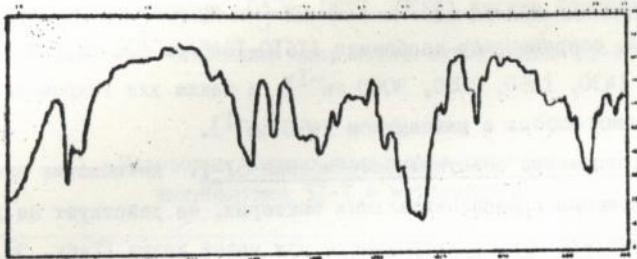


Рис. 6 ИК спектр антибиотика 5I-I

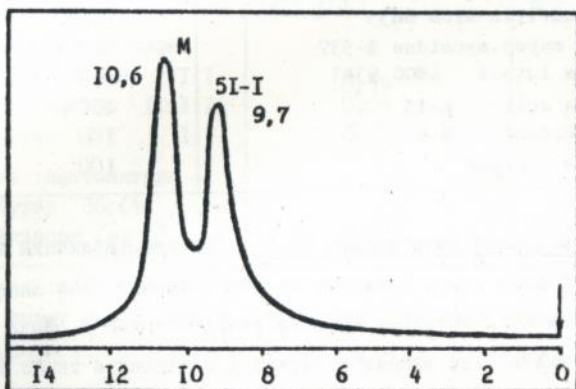


Рис. 7 ВЭЖХ смеси антибиотика 5I-I и митрамицина (М).

По оси абсцисс - время удерживания (мин.), в масштабе проводится оптическая плотность, длина волны 270 нм. Элюант: ацетонитрил-фосф.буфер (36:64)

ной или лактонной связей ( $I_{230}$ ,  $I_{730}$   $\text{см}^{-1}$ ), ароматические структуры ( $I_{540}$   $\text{см}^{-1}$ ), сопряженного карбонила ( $I_{610}$ - $I_{645}$   $\text{см}^{-1}$ ), группы  $\text{CH}_3$  и  $\text{CH}_2$  ( $I_{390}$ ,  $I_{430}$ ,  $I_{450}$ ,  $2950$ ,  $3000$   $\text{см}^{-1}$ ), а также для гидроксильных групп (широкая полоса с максимумом  $3450$   $\text{см}^{-1}$ ).

Биологические действия антибиотика 5I-I. Антибиотик высокоактивен в отношении грамположительных бактерии, не действует на грам-отрицательные бактерии и микромицеты при малых дозах (Табл. 3).

Таблица 3  
Антимикробная активность антибиотика 5I-I

Наименование тест-микроорганизмов	минимальная подавляющая концентрация (мкг/мл)
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0,02
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,002
<i>Bac.cereus</i> subsp. <i>mycoides</i> R-537	0,001
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0,02
<i>Escherichia coli</i> K-13	100
<i>Candida albicans</i> M-D	100
<i>Aspergillus niger</i>	100

Идентификация антибиотика 5I-I. Для идентификации антибиотика 5I-I мы провели поиск аналогов по компьютерной базе данных природных биологически активных веществ разработанной Я.Берди (Венгрия). Настоящее время в базе данных содержатся сведения о свыше 16 тысяч антибиотических веществ природного происхождения. Поиск проводили введением в компьютер полученных аналитических данных по молекулярной массе и Уф спектру.

В результате компьютерного поиска вышли на антибиотики группы ауресоловой кислоты, насчитывающие в настоящее время 47 представителей. Наиболее близок антибиотик 5I-I оказался к митрамицину, однако

отличается от него по некоторыми физико-химическими свойствами. В таблице 4 приведены некоторые показатели антибиотика 5I-I и митрамицина.

Таблица 4

Некоторые физико-химические свойства  
антибиотика 5I-I и митрамицина

Свойства антибиотиков	наименование антибиотиков	
	антибиотик 5I-I	митрамицин
Температура плавления $^{\circ}\text{C}$	185	180-183
Угол вращения (с 1,0 ЕТОН)	+ 72,4	- 5I
Молекулярная масса	1085	1085
УФ спектр $\lambda$ $\frac{\text{CH}_3\text{OH}}{\text{мак}}$ $\text{nm}(\text{E}_{1\%}^{1\text{cm}})$	200, 229, 289, 315, 428, (224, 172, 509, 71, 101)	240, 285, 515, 425 (183, 475, 72, 105)
Тонкослойная хроматография		
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - бензол - $\text{MeOH}$ 2:I:I	0,39	0,4I
$\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$ - ацетон II:I:I	0,03	0,02
бензол - ацетон I:I	0,77	0,74
ВЭЖХ элюент ацетонитрил - фосфатный буфер 36:64 время удерживания (мин.)	9,7	10,6

Как видно из таблицы 4 антибиотик 5I-I отличается от митрамицина по оптическим свойствам и по данным ВЭЖХ. На основании полученных данных мы считаем, что антибиотик 5I-I является новым представителем группы ауреоловой кислоты.

В настоящее время НИИ по изысканию новых антибиотиков АМН России начато изучение химического строения этого антибиотика, а также продолжается работа по исследованию его лечебных свойств.

## ВЫВОЛЫ

1. Из образцов почвы пустыни Гоби выделена культура стрептомицета которая идентифицирована как разновидность *Streptomyces phaeofaciens* ssp. штамм 5I. В процессе естественной и индуцированной изменчивости штамм 5I расщепляется на 3 морфологические типы колонии. I тип колонии составляет 93,1%, II тип колоний 6,5% и III тип колоний 0,4%.

2. В результате подбора и оптимизации питательных сред была разработана комплексная среда для биосинтеза антибиотика культурой *Str.phaeofaciens* ssp. штамм 5I, позволяющая увеличить антибиотическую активность культуральной жидкости на 50% по сравнению с исходной средой.

3. Разработан экстракционный метод выделения антибиотика из культуральной жидкости и мицелия. Антибиотик накапливается в основном в культуральной жидкости (80%) и только 20% в мицелии. Данный антибиотик является комплексным соединением, состоящий из трех компонентов, причем основной компонент 5I-I составляет 90-95% от общего количества комплекса.

4. Антибиотик 5I-I получен в хроматографическом чистом виде, проведена идентификация. Антибиотик 5I-I является новым представителем группы ауреоловой кислоты.

5. Антибиотик 5I-I высокоактивный в отношении грамположительных бактерии, но не действует на грамотрицательные бактерии и микровицеты.

6. Установлено, что *Str.phaeofaciens* ssp. штамм 5I синтезирует новый антибиотик группы ауреоловой кислоты. Для культур вида *Str.phaeofaciens* образование антибиотиков этой группы ранее не отмечалось.

Список работ, опубликованных по  
материалам диссертации

1. Б. Даваадорж, Барламова Т.С. К изучению токсичности некоторых актиномицетов выделенных из почв МНР. // Труды института ОЭБ АН МНР, № 21, 1985.
2. Б. Даваадорж К исследованию по изысканию продуцентов кормовых антибиотиков среди актиномицетов. // Труды института ОЭБ АН МНР, № 23, 1987.
3. Б. Даваадорж, Терехова Л.П., Цэцэг Б., Лайко А.В., Пунцаг Т. *Streptomyces phaeofaciens* штамм 5I-продуцент нового антибиотика группы aureоловой кислоты. // В печати.
4. Б. Даваадорж, Федорова Г.Б., Архангельская Н.М., Лайко А.В., Сумарукова И.Г., Токарева Н.Л., Катруха Г.С., Цэцэг Б. Новый антибиотик из группы aureоловой кислоты. // В печати.
5. Б. Даваадорж, Федорова Г.Б., Лайко А.В., Катруха Г.С., Архангельская Н.М. Экстракционный метод выделения и идентификация антибиотика 5I продуцируемого *Str. phaeofaciens* ssp. штамм 5I. // В печати.



284 595

AB 25.822

**AB 25.822**