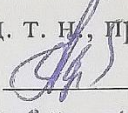


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
(Биологический институт)
Кафедра экологии, природопользования и экологической инженерии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

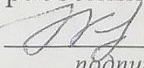
Руководитель ООП
Зав. каф. экологии,
природопользования и экологической
инженерии
д. т. н., проф., к. б. н.
 А. М. Адам
«03.» 06. 2019 г.

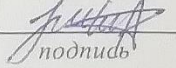
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФДОВ ЖЕЛЕЗА *DESULFOVIBRIO* SP. AY5 ПРИ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ В БИОРЕАКТОРЕ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНЫХ РН

по основной образовательной программе подготовки бакалавров
направление подготовки
05.03.06 – Экология и природопользование

Иванов Михаил Вадимович

Руководитель
Доктор биологических наук.
Профессор зав. каф физиологии
растений и биотехнологии
 О. В. Карначук
подпись
« 03. » 06. 2019 г.

Студент группы № 01507
 М. В. Иванов
подпись

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра экологии, природопользования и экологической инженерии

УТВЕРЖДАЮ

Зав. каф. экологии,
природопользования
и экологической инженерии

_____ А.М. Адам

«_____» _____ 2019г.

ЗАДАНИЕ

По подготовке ВКР Бакалавра

Студенту Иванову Михаилу Вадимовичу группы 01507

1.Тема выпускной квалификационной работы: образование сульфидов железа *desulfovibrio* sp. AY5 при культивировании в биореакторе в условиях различных pH.

2.Срок сдачи студентом выполненной выпускной квалификационной работы:

а) заведующему кафедрой _____

б) в ГЭК _____

3.Исходные данные к работе:

- **Объект исследования** – штамм бактерий *Desulfovibrio* sp. AY 5.
- **Предмет исследования** – физиологические характеристики бактерии *Desulfovibrio* sp. AY 5.
- **Цель исследования** – изучить образование сульфидов железа штаммом *Desulfovibrio* sp. AY 5, выделенного из пациентов с расстройством аутистического спектра, при его культивировании в биореакторе в условиях различных pH.

Задачи:

- 1) Получить биогенные сульфиды железа образованные *Desulfovibrio* sp. AY 5 при непрерывном культивировании на разных значениях pH;
- 2) Изучить минералогический состав образованных сульфидов железа;
- 3) Определить количество продуцируемого H₂S *Desulfovibrio* sp. AY 5 на разных значениях pH.

- **Методы исследования:** эмпирические и теоретические.

4. Краткое содержание работы:

- I. Описание сульфатредуцирующих бактерий.
- II. Описание и постановка эксперимента по культивированию штамма.
- III. Анализ полученных результатов.

5. Указать предприятие, организацию по заданию которого выполняется работа:

Лаборатория биохимии и молекулярной биологии НИИ биологии и биофизики ТГУ.

6. Дата выдачи задания «_____» _____ 20__ г.

Руководитель ВКР

Доктор биологических наук. Профессор
зав. каф физиологии растений и биотехнологии
О. В. Карначук

должность, место работы

подпись

инициалы, фамилия

Задание принял к исполнению «___» _____ 20__ г.

дата

подпись студента

АННОТАЦИЯ

Тема дипломной работы – образование сульфидов железа *Desulfovibrio* sp. AY5 при культивировании в биореакторе в условиях различных значений pH. Структура исследования обусловлена целью и задачами, поставленными и реализованными в процессе исследовательской работы. Материал состоит из введения, трёх глав, вывода и списка использованных источников литературы.

Во введении данной работы обоснован выбор темы, актуальность, а также сформулированы цель и задачи, определены предмет и объект исследования.

В работе рассмотрена способность к образованию сульфидов железа штаммом *Desulfovibrio* sp. AY5 при непрерывном и периодическом культивировании на разных значениях pH.

Работа позволяет выявить зависимость между количеством клеток, выработкой ими H_2S и количеством образованных бактериями сульфидов железа на разных значениях кислотности в условиях непрерывного и периодического культивирования.

ANNOTATION

The subject of the thesis – the formation of iron sulfides *Desulfovibrio* sp. AY5 when cultivated in a bioreactor under various pH conditions. The structure of the study is determined by the goals and objectives established and implemented in the process of research work. The material consists of an introduction, three chapters, conclusion and list of references used.

In the introduction, the choice of topic, relevance, as well as formulated goals and objectives, the subject and object of research.

The article discusses the ability to form iron sulfides by the strain *Desulfovibrio* sp. AY5 with continuous and intermittent cultivation at different pH values.

The work makes it possible to reveal the relationship between the number of cells, the production of H_2S by them and the number of iron sulfides produced by bacteria at different values of acidity under continuous and periodic cultivation conditions.

ЗАЩИЩАЕМЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В процессе жизнедеятельности бактерий в желудочно-кишечном тракте человека происходит перевод ионов металлов, прежде всего железа, в нерастворимые сульфиды, что может оказывать негативное воздействие на организм.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Общая характеристика сульфатредуцирующих бактерий	11
1.1.1 Разнообразие СРБ.....	13
1.1.2 Распространение СРБ.....	14
1.1.3 1.1.3Микробиом человека	15
1.3 Роль СРБ в кишечнике человека	17
1.4 Роль СРБ в кишечнике людей с расстройством аутистического спектра	19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.1 Объект исследования	21
2.2 Культивирование сульфатредуцирующих бактерий	23
2.2.1 Приготовление основной питательной среды и добавок к ней.....	24
2.2.2 Внесение добавок в среду Видделя	26
2.2.3 Приготовление добавок к биореактору	27
2.3 Микроскопирование	28
2.4 Определение числа клеток	29
2.5 Осаждение крупных частиц сульфидов металлов	29
2.6 Определение сероводорода (H ₂ S) по Пахмайру.....	31
2.7 Приготовление посуды для эксперимента.....	31
2.8 Методика отбора проб из биореактора	31
2.9 Рентгенофазовый анализ	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	35
ВЫВОДЫ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	37
ПРИЛОЖЕНИЕ	40

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

КЖК – короткоцепочечные жирные кислоты;

Мг – миллиграмм;

Мл – миллилитр;

РАС – расстройство аутистического спектра;

СРБ – сульфатредуцирующие бактерии;

LPS – липополисахариды-производящая бактерия.

ВВЕДЕНИЕ

Физиология микроорганизмов изучает жизнедеятельность бактерий, их метаболизм, питание, рост и размножение, а также взаимодействие бактерий с окружающей средой. В настоящее время не вызывает сомнений влияние микробиома на здоровье и жизнедеятельность человека. Человеческий организм – это сложное симбиотическое сообщество многочисленных эукариотических и прокариотических клеток, вирусов и архибактерий, слаженно работающих в конкретной среде. Дисбаланс данной системы приводит вначале к изменениям в физиологических функциях и реакциях организма, а затем и к развитию разнообразных заболеваний.

В 70-ых годах прошлого столетия, были открыты первые сульфатредуцирующих бактерии, выделенные из ЖКТ человека, а также было показано, что в целом сульфатредуцирующие бактерии, являются частью нормальной микрофлоры человека (Moore et al, 1976).

Литературные данные свидетельствуют о повышенной концентрации СРБ, относящихся к роду *Desulfovibrio*, в кишечнике пациентов, страдающих расстройством аутистического спектра (РАС) (Mezzelani¹, Landini¹, 2015). Иммунный статус людей, страдающих этим заболеванием, втрое ниже, чем у здоровых людей. Более того было замечено, что у этих больных в организме наблюдался дефицит железа (Rebecca Lane, 2015).

В современной литературе обсуждается не только цитотоксическое, но и возможное канцерогенное действие H_2S , образуемого сульфатредуцирующими микроорганизмами (Attene-Ramos et al., 2006). Кроме того, имеются данные о положительном воздействии сероводорода на здоровье человека. (Carbonero et al., 2012). Являясь сигнальной молекулой наряду с NO и CO в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) (Linden et al., 2010; Wang et al., 2010), сероводород оказывает положительное влияние на вазорелаксацию, а также противовоспалительное действие в различных тканях млекопитающих (Kumara, 2010).

Тем не менее, деятельность СРБ, присутствующих в организме человека, может быть потенциальной причиной воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, включая язвенный колит, вызванный избыточным количеством сероводорода (Zinkevich and Beech, 2000; Loubinoux et al., 2002).

Мы считаем, что важным аспектом жизнедеятельности СРБ в кишечнике может быть не только негативное воздействие за счет образования H_2S , но и за счет перевода ионов металлов, прежде всего, железа, в нерастворимые сульфиды. Химически высокореакционный сероводород реагирует с доступными ионами металлов с образованием сульфидов металлов, обладающих чрезвычайно низкой константой растворимости, тем самым вызывая дефицит доступных металлов в организме. Процесс образования сульфидов металлов под действием СРБ хорошо известен для природных экосистем и используется в биотехнологиях очистки от металлов. До сих пор никто не обращал внимания на возможность протекания аналогичных реакций в кишечнике человека и животных.

Изучение процессов жизнедеятельности сульфатредуцирующих бактерий, полученных непосредственно из микробиома человека, поможет внести ясность о возможном негативном влиянии СРБ на людей с РАС. Именно поэтому важно до конца понять значение и функции СРБ для организма человека, страдающего этим заболеванием.

Целью данной работы явилось изучить образование сульфидов железа штаммом *Desulfovibrio* sp. AY 5, выделенного из пациентов с расстройством аутистического спектра, при его культивировании в биореакторе в условиях различных pH.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1) Получить биогенные сульфиды железа образованные *Desulfovibrio* sp. AY 5 при непрерывном культивировании на разных значениях pH;
- 2) Изучить минералогический состав образованных сульфидов железа;
- 3) Определить концентрацию продуцируемого H_2S , а так же количество клеток *Desulfovibrio* sp. AY 5 при культивировании на разных значениях pH.

- Объектом исследования является штамм бактерий *Desulfovibrio* sp. AY 5
- Предметом исследования являются физиологические характеристики бактерии *Desulfovibrio* sp. AY 5.

Автор выражает благодарность научному руководителю зав. кафедрой физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета д-ру биологических наук, профессору О. В. Карначук за возможность выполнять исследования на высоком методологическом уровне. Автор глубоко признателен Бухтияровой П. А. и Анциферову Д. В. за помощь при проведении экспериментов и предоставленный штамм.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Общая характеристика сульфатредуцирующих бактерий

Сульфатредуцирующие бактерии (так же сульфидогенные или десульфатирующие) – это прокариотические микроорганизмы, относящиеся как к бактериям, так и к археям, а также являющиеся одной из самых древних физиологических групп микроорганизмов, живущих на земле.

Предполагают, что первые проявления микробного метаболизма связаны с возникновением бактериального фотосинтеза. Фотосинтезирующие серные бактерии перевели восстановленные формы серы в сульфаты, а сульфаты затем стали использоваться сульфатредукторами в качестве акцепторов электронов. Результаты деятельности СРБ обнаружены в породах верхнего архейского возраста Алданского щита Сибири (3×10^9 лет) и отложений железа в районе Мичикопотен и Вуменривер в Канаде ($2,75 \times 10^9$ лет). Эти находки более точно определяют время появления сульфатредуцирующих бактерий в интервале $2,8-3,7 \times 10^9$ лет (Буракаева с соавт., 1999).

Восстановление микроорганизмами полностью или частично окисленных соединений минеральной серы в анаэробных условиях за счет окисления органического вещества или водорода называют микробной сульфатредукцией. Этот процесс был открыт русским химиком Н. Д. Зелинским в 1890-1893 гг, а первая чистая культура СРБ была выделена и описана Бейеринком в 1895 г.

Основные принципы биохимии сульфатредуцирующих бактерий были изучены в 1950-е и 1960-е года. *Desulfovibrio* стали первыми анаэробами, в клетках которых был обнаружен цитохром (Ishimoto et al, 1954; Postgate, 1954).

Для представителей группы характерны хемоорганоавто- и гетеротрофия, а также хемолитоавто- и гетеротрофия.

СРБ – это группа, для которой характерна способность к образованию сероводорода из сульфата. Поскольку такое восстановление сульфата обладает формальным сходством с дыханием, при котором акцептором водорода служит кислород, принято говорить о сульфатном дыхании, или о *диссимиляционной сульфатредукции*. Процесс восстановления сульфатов (сульфатное дыхание) сопряжён с мембраной.

Главным продуктом такого процесса является сероводород:



Большая часть сероводорода, образующегося в природе, возникает благодаря этой реакции. Большинство сульфатредуцирующих бактерий является, в отличие от нитратредуцирующих, облигатными анаэробами, т.е. нуждаются в строго анаэробных условиях.

В настоящее время СРБ разделяют на две основные группы: первая, преобразует органические соединения не полностью (до ацетата), а вторая – преобразует органические соединения полностью до диоксида углерода (Muyzer, 2008). К настоящему времени полностью описан метаболический принцип сульфатредукции, показанный на Рисунке 1 (Rabus et al., 2013).

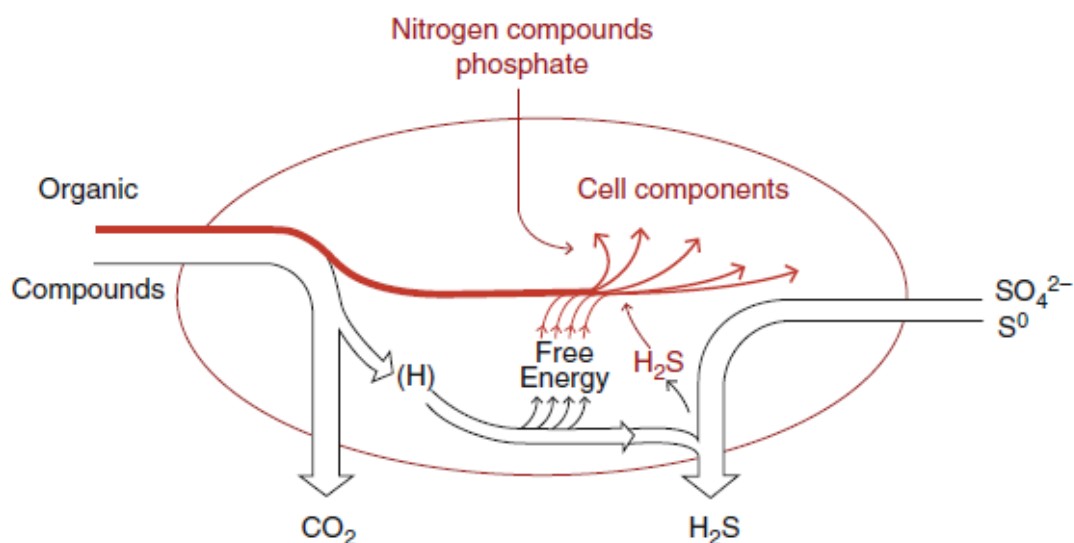


Рисунок 1 – Метаболический принцип сульфатредукции (Rabus et al., 2013):

Примечание: катаболизм изображен черным, анаболизм красным

Сам процесс проходит в три этапа:

- Отрыв электрона от субстрата (молекулярный водород, пируват, ВЖК, этанол, лактат)
- Перенос электронов по дыхательной цепи (переносчики — Fe-S-белки, хиноны, цитохромы b и c)
- Присоединение электронов к конечному акцептору

В последние годы обнаружена способность ряда сульфатредуцирующих бактерий к восстановлению в энергетическом процессе нитратов и нитритов до аммония (NO_2^- и $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$), селената до селенита (SeO_4^{2-} переходит в SeO_3^{2-}), фумарата до сукцината ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$) (Rabus et al., 2013).

В частности, способность некоторых сульфатредукторов к росту на ароматических углеводородах позволяет использовать их для утилизации таких углеводородов, как бензол, толуол, ксилол, этилбензол и некоторых других, в случаях, когда этими углеводородами загрязнены почвы.

Большинство сульфатредуцирующих бактерий хорошо растут при температуре 25-30 °С. Для отдельных видов оптимальная температура несколько выше (37-46 °С). Известны и термофильные виды, растущие при температуре выше 50 °С.

Некоторые виды СРБ способны к спорообразованию (р. *Desulfotomaculum*, р. *Desulfonispota*, р. *Desulfoporosinus*).

Обычно среды содержат также в значительном количестве сульфаты и железо (FeS), которое выпадает в осадок. Это имеет значение для детоксикации сероводорода, а также позволяет судить о росте сульфатредуцирующих бактерий, т. к. осадок сульфида имеет черный цвет.

В то же время присутствие небольшого количества сульфида может быть важно для роста сульфатредуцирующих бактерий, поскольку он относится к числу восстановителей.

По состоянию на 2009 год известно 220 видов сульфатредукторов в 60 родах.

1.1.1 Разнообразие СРБ

Большинство СРБ в настоящее время относятся к мезофильным неспорообразующим анаэробным формам протеобактерий. Основным акцептором электронов для таких микроорганизмов считается сульфат. Однако в его отсутствие акцепторами электронов могут служить и другие соединения серы: сульфит, тиосульфат и элементная сера, за счет которых СРБ могут осуществлять рост (Widdel, Bak, 1992).

Помимо соединений серы, многие СРБ для анаэробного дыхания могут использовать нитраты и нитриты, акцепторами электронов могут выступать также и органические соединения, например, фумарат (Jonkers et al., 1996). Также акцепторами электронов могут быть соединения тяжелых металлов, например, железо (III) (Park et al., 2007), мышьяк (VI) (Masu et al., 2000). Однако данные процессы дыхания не всегда связаны с ростом культуры и, вероятно, обеспечивают ее только энергией для существования. Донорами электронов для СРБ могут быть: молекулярный водород, жирные кислоты, моно- и дикарбоновые кислоты, некоторые аминокислоты, некоторые спирты (этанол, глицерол), некоторые

сахара, фенил-содержащие кислоты и другие ароматические соединения (Кузнецов, 1985; Widdel, Bak, 1992).

По морфологическим и физиологическим признакам сульфатредуцирующие бактерии очень разнообразны. Среди них встречаются одноклеточные и нитчатые формы, которые передвигаются с помощью жгутиков или скольжением, а также неподвижные (Postgate, 1984). СРБ могут быть представлены различными морфологическими типами клеток: кокки, овальные или длинные прямые палочки, более или менее изогнутые палочки или спирали, вибрионы, «пачки клеток», клетки с газовыми вакуолями, скользящие многоклеточные нити – филаменты (Widdel, Bak, 1992).

Представители рода *Desulfovibrio* – слегка изогнутые, неспороносные палочки с полярно расположенным жгутиком (*D. desulfuricans*) или пучком жгутиков (*D. gigas*, *D. africanus*).

Род содержит около 65 опубликованных видов [Gut microbiota info]. Кроме описанных, выделены СРБ родов *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, нитчатые бактерии рода *Desulfonema* и другие (Чурикова, Виктор, 1994).

По отношению к температуре различают мезофильные, термофильные, психрофильные, термотолерантные формы СРБ. Так же сульфатредуцирующие бактерии включают представителей, способных существовать в экстремальных условиях, например при низкой температуре – психрофилы и психротрофы или при пониженном рН среды – ацидофилы и ацидотолерантные бактерии.

Многие из СРБ относятся к категории строгих анаэробов, для роста которых требуется не только отсутствие O_2 , но и низкий окислительно-восстановительный потенциал среды. В то же время некоторые штаммы проявляют устойчивость к O_2 и не только выживают при разной длительности присутствия O_2 , но и предпочитают для роста именно аэробные условия, что позволяет увидеть все многообразие метаболических возможностей, которое не встретишь у других живых организмов.

1.1.2 Распространение СРБ

Сульфатредуцирующие бактерии почти всегда присутствуют в анаэробных зонах различных экосистем. Среди СРБ существуют как мезофильные, так и термофильные микроорганизмы.

Мезофильные неспорообразующие бактерии являются самыми распространенными СРБ в природе, так как цикл серы в море зависит от сульфатредукции и в основном

осуществляется в процессе жизнедеятельности членов этого подкласса (Widdel, Bak, 1992). Этот вид бактерий в основном встречается в сероводородном иле, где органические вещества подвергаются анаэробному разложению (Шлегель, 1987). Предпочтительные местообитания для СРБ, вследствие высокого содержания сульфатов и соли – это моря, эстуарии, соленые озера.

Активная сульфатредукция так же была зафиксирована в почвах, осадках и воде пресных водоемов (Widdel, Bak, 1992).

Кроме того, СРБ обнаружены в желудке (рубце) овцы (Howard and Hungate, 1976) и в кишечнике человека (Beerens and Romond, 1977; Moore et al., 1976).

1.1.3 Микробиота человека

Как уже говорилось ранее, организм человека представляет сложный «суперорганизм», представляющий многочисленное сообщество эукариотических и прокариотических клеток, вирусов и архибактерий. Любые нарушения работы такого организма, выходящие за пределы его компенсаторных возможностей, приводят вначале к изменениям в физиологических функциях и метаболических реакциях, а затем и к развитию разнообразных заболеваний.

Так же нормальная микробиота кишечника является одним из барьеров на пути экзогенной инфекции, т. е. участвует в обезвреживании токсинов, ограничивая болезнетворность токсигенных бактерий и их размножение.

Нарушения в составе и функциях микробиоты наиболее часто происходят по двум причинам. Одна из них связана с гибелью бактерий под влиянием антимикробных препаратов, прежде всего антибиотиков, которые уничтожают определенный круг микроорганизмов и не являются резистентными для других. Вторая сопряжена с реактивной перестройкой микробиоты в ответ на изменение той среды, где сосредоточен данный микробиоценоз. Несмотря на то, что кишечная микробиота достаточно устойчива к переменам в диете и стрессам, в ряде случаев кишечник меняет соотношение микроорганизмов, реагируя на разнообразные нарушения гомеостаза (Шапошникова Л.И. 2006).

Общее число бактерий, населяющих различные отделы человеческого организма, на порядок превышает численность его собственных клеток. Наибольшее количество микроорганизмов приходится на желудочно–кишечный тракт, включая ротоглотку (75–78

%), остальные заселяют мочеполовые пути (до 2–3 % у мужчин и до 9–12 % у женщин) и кожные покровы.

С возрастом микробиом человека стремится к стабильности. У каждого человека есть индивидуальный микробиом, даже у гомозиготных близнецов, находящихся в одинаковых условиях питания. Этот микробиом отражает состояние здоровья человека и является неким специфическим биомаркером.

Толстая кишка представляет собой сложную микробную экосистему, в которой бактерии существуют во множестве метаболических ниш. Микробиота содержит несколько сотен бактериальных видов, подвидов и биотипов.

Развитие микробиоты кишечника начинается с рождения. Пищеварительный тракт новорожденных быстро колонизируется микроорганизмами от матери (вагинальными, фекальными, кожными, микроорганизмами с груди и т. д.).

С третьего дня состав кишечной флоры напрямую зависит от того, как младенца кормят: например, микробиота младенцев на грудном вскармливании, в основном, преобладают *Bifidobacteria*, по сравнению с младенцами, питающимися детским питанием. Считается, что к 3 годам микробиота становится стабильной и похожей на таковой у взрослых, продолжая свою эволюцию более стабильным темпом на протяжении всей жизни.

Кишечная микробиота играет важную роль в нашей жизни и в том, как функционирует наше тело.

Есть более 3 миллионов микробных генов в нашей кишечной микробиоте. Это в 170 раз больше генов, чем в геноме самого человека. Микробиота, в общей сложности, может весить до 2 кг. Основной функцией микробиоты кишечника человека является помощь в сборе питательных веществ и энергии из продуктов, которые мы употребляем. Компоненты, которые не всасываются в проксимальном кишечнике, попадают в дистальный кишечник, где они метаболизируются посредством процессов, которые связаны с трофическими взаимодействиями между членами микробного сообщества. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы разрушают белки, жиры и углеводы первичными ферментерами, получая короткоцепочечные жирные кислоты (например, ацетат, пропионат и бутират) и газы (например, H_2 и CO_2). Эти продукты ферментации не только воздействуют на организм хозяина, но также служат источниками углерода и энергии для других членов сообщества. В количественном отношении крахмалы и некрахмальные полисахариды (диетическое волокно) являются основными источниками углерода и энергии для бактерий, обитающих в толстой кишке (Macfarlane и McBain, 1999).

1.3 Роль сульфатредуцирующих бактерий в кишечнике человека

Сульфатредуцирующие бактерии являются нормальными обитателями кишечника у людей и животных. Первые исследования по поиску этих микроорганизмов были проведены еще в 70-ых годах XX века (Moore et al, 1976). Через год после открытия эти бактерии были идентифицированы как *Desulfomonas* и *Desulfovibrio*, а впоследствии изолированы (Beerens, Romond, 1977).

Хотя сульфат-редуцирующая активность не ограничивается определенной филогенетической группой, СРБ в толстом кишечнике человека являются преимущественно членами рода *Desulfovibrio* в классе δ -*Proteobacteria*. Они могут использовать H_2 или органические соединения (например, лактат, формиат) в качестве доноров электронов для восстановления сульфита. Соединения с серой используются в пищевой промышленности в качестве консервантов и антиоксидантов в различных продуктах (хлеб, консервированное мясо, сухофрукты, вино), а затем поступают в человека вместе с пищей.

Gibson et al, 1988 сообщили, что преобладающим СРБ в человеческих фекалиях были десульфовибрионы, в дальнейшем отнесенные к роду *Desulfobacter*. Так же в конце 80-ых годов из образцов стула испытуемых были выделены *Desulfotomaculum* и *Desulfobulbus* (Gibson and Macfarlane, 1988). В целом в организме человека выделяют несколько основных групп СРБ это – *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus* и *Desulfotomaculum*.

Колебания СРБ в разных популяциях людей сильно различаются. Например, эти бактерии были обнаружены в 70 % образцов стула британских испытуемых. (Gibson et al., 1988).

Таким образом, эти бактерии могут быть основным компонентом колониальной микробиоты у некоторых людей, и, как будет обсуждаться ниже, могут влиять на физиологические и психические функции организма хозяина.

Ткани хозяина и другие субстраты эндогенного происхождения (отмершие эпителиальные клетки, муцины, панкреатические и другие выделения) постоянно разлагаются и перерабатываются бактериями, растущими в толстом кишечнике, однако видовой состав и метаболические активности кишечной микробиоты в основном определяются диетой. (Macfarlane и McBain, 1999). Основные продукты ферментации в толстой кишке – ацетат, КЖК, пропионат, бутират, H_2 и CO_2 .

Другие продукты ферментации включают лактат, сукцинат и этанол, а также CH_4 у некоторых особей присутствуют амины, фенолы, индолы, H_2S и тиолы, полученные из аминокислот (Каммингс и Макфарлейн, 1991).

Многие из этих продуктов ферментаций дополнительно метаболизируются кросс-кормящими видами, такими как СРБ (Gibson, 1990). Исследования по использованию субстрата СРБ человека показали, что эти организмы использовали широкий спектр доноров электронов, как показано на рисунке.

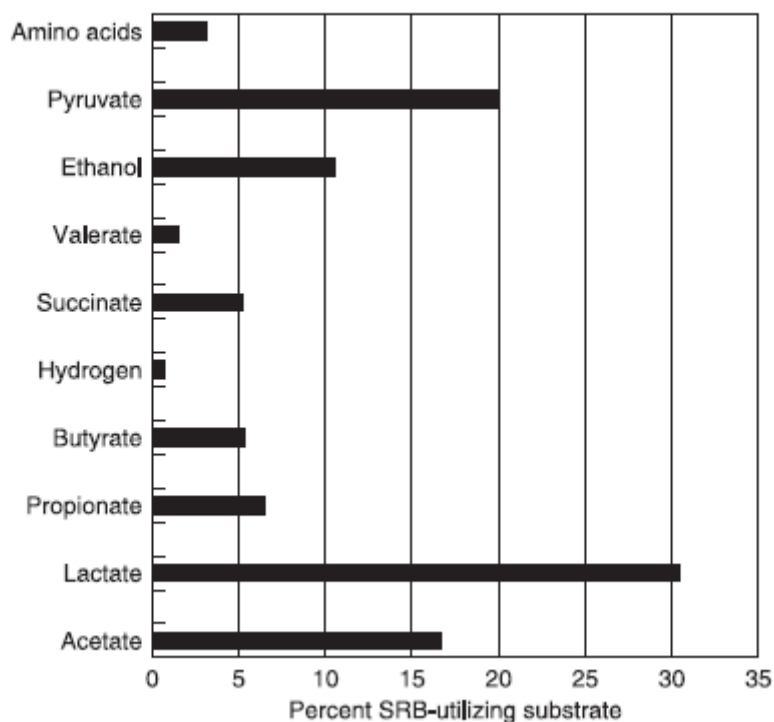


Рисунок 2 – Использование различных субстратов СРБ (Gibson and Macfarlane, 1988)

Лактат, пируват, ацетат и этанол были наиболее приемлимы для данного вида организмов. (Gibson and Macfarlane, 1988).

1.4 Роль сульфатредуцирующих бактерий, в кишечнике людей страдающих расстройством аутистического спектра

Разработка методов секвенирования нового поколения, а так же проект (The Human Microbiome Project) позволили определить почти всю человеческую микробиоту и идентифицировать геномы многих микроорганизмов. Анализ секвенированной 16S-rРНК бактерий, обнаружили многие виды, которые никогда не культивировались и не описывались ранее (Finegold SM 2010)

В связи с этим было проведено несколько исследований в попытке профилировать микробиоту людей страдающих РАС, в сравнении с их здоровыми братьями и сестрами или несвязанных с ними людьми контрольной группы.

Несмотря на то, что в немногих исследованиях сообщалось о малых или вообще отсутствии различий в составе микробиоты кишечника между детьми с РАС и их здоровыми братьями и сестрами, дисбаланс в микробиоте кишечника в образцах стула детей с РАС хорошо виден, особенно по сравнению с образцами контрольной группы.

Мета-геномный анализ стула пациентов с РАС, показал, что микробиота таких людей существенно отличается от контроля и состоит более чем из 1000 различных видов микроорганизмов по сравнению с 530 у здоровых детей. Кроме того, среди микрофлоры пациентов с РАС, недопредставлены актинобактерии, особенно бифидобактерии, и чрезмерно представлены большинство бактероидов и протеобактерий по сравнению с контролем.

Недавний доклад междисциплинарной группы Гарвардской школы общественного здравоохранения, пришел к выводу, что основанные на фактах данные, рекомендации для оценки, диагностика и лечение желудочно-кишечных расстройств у людей с аутизмом не доступны для большинства пациентов. Эти люди заслуживают такого же тщательного уровня обслуживания и лечения, как и пациенты без расстройств аутистического спектра (Hornig M., 2008). Снижение бифидобактерий, которые помогают детям развивать врожденный иммунитет, в микробиоте пациентов с РАС, может объяснять разрастание патогенных организмов., так как именно бифидобактерии ответственны за становление иммунной системы на ранних этапах развития ребенка. Тип *Bacteroidetes* был обнаружен в высоких количествах в группе с сильным аутизмом, тогда как *Firmicutes* были более преобладающими в контрольной группе. Меньшие, но значительные различия также имели место в типах бактерий *Actinobacterium* и *Proteobacterium*.

Бактерии *Desulfovibrio*, род грамотрицательных СРБ, был обнаружен в пробах у 50 % детей с расстройством аутистического спектра. Эти сульфатредуцирующие и липополисахариды-производящая бактерия (LPS) может быть ответственна за aberrantный метаболизм серы и высокий уровень сывороточного эндотоксина, описанный у людей с РАС. Несмотря на неспособность к спорообразованию, *Desulfovibrio* может избегать лечения, находясь внутри кишечной биопленки, которая защищает ее от антибиотиков, принимаемых хозяином.

Desulfovibrio в основном встречается гораздо чаще в стуле детей с сильным аутизмом, чем в контроле, (хотя разница не велика).

> 2 years	Health Gut Resilience	Adult-type Microbiota	ASD Microbiota ¹
	Firmicutes	64%	38%
	Bacteroidetes	30%	51%
	Actinobacteria	2%	0,5%
	Proteobacteria	0,5%	3%
	Others	3,5%	7,5%

Рисунок 3 – Состав и развитие микроорганизмов кишечника у здоровых и детей, страдающих аутизмом, старше 2 лет

(Alessandra Mezzelani¹, Martina Landini¹, Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility.)

Кроме того, СРБ могут являться причинами серьезных инфекций. Этот род производит сероводород, который является важным фактором вирулентности, а также, как известно, подвергает коррозии различные металлы. Эти микроорганизмы могут иметь возможность осаждать определенные металлы, переводя их в класс нерастворимых сульфидов, такие как железо, ртуть, молибден и т.д. в кишечнике, делая их бионедоступными для организма хозяина.

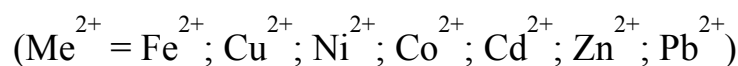
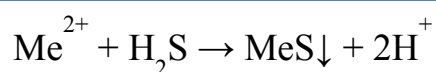


Схема осаждения некоторых металлов при взаимодействии с сероводородом

А так как у детей с РАС нарушена коммуникативная способность, вызываемые СРБ беспокойства, могут наносить куда больший вред чем нормальным детям.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования и его характеристика

В качестве исследуемого объекта в экспериментах по изучению физиологических характеристик, был выбран штамм бактерии *Desulfovibrio* sp. AY5. Штамм представлен подвижными вибрионами. По гомологии последовательности гена 16S рРНК он оказался наиболее близок к *desulfovibrio desulfuricans* (AF192153)

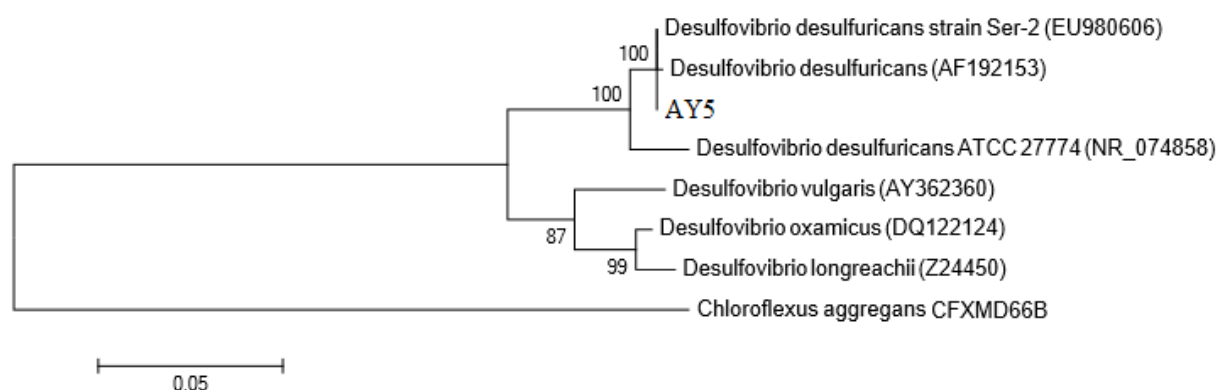


Рисунок 4 – Филогенетическое положение штамма AY5 на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК методом neighbor-joining.

Штамм, был выделен Бухтияровой П. А из образцов стула детей, страдающих расстройствами аутистического спектра. Образцы были предоставлены Областным государственным бюджетным учреждением здравоохранения «Томская клиническая психиатрическая больница» (договор №607 от 10 февраля 2014 г).

Данная культура представлена подвижными хаотично двигающимися вибрионами (Рисунок 5).

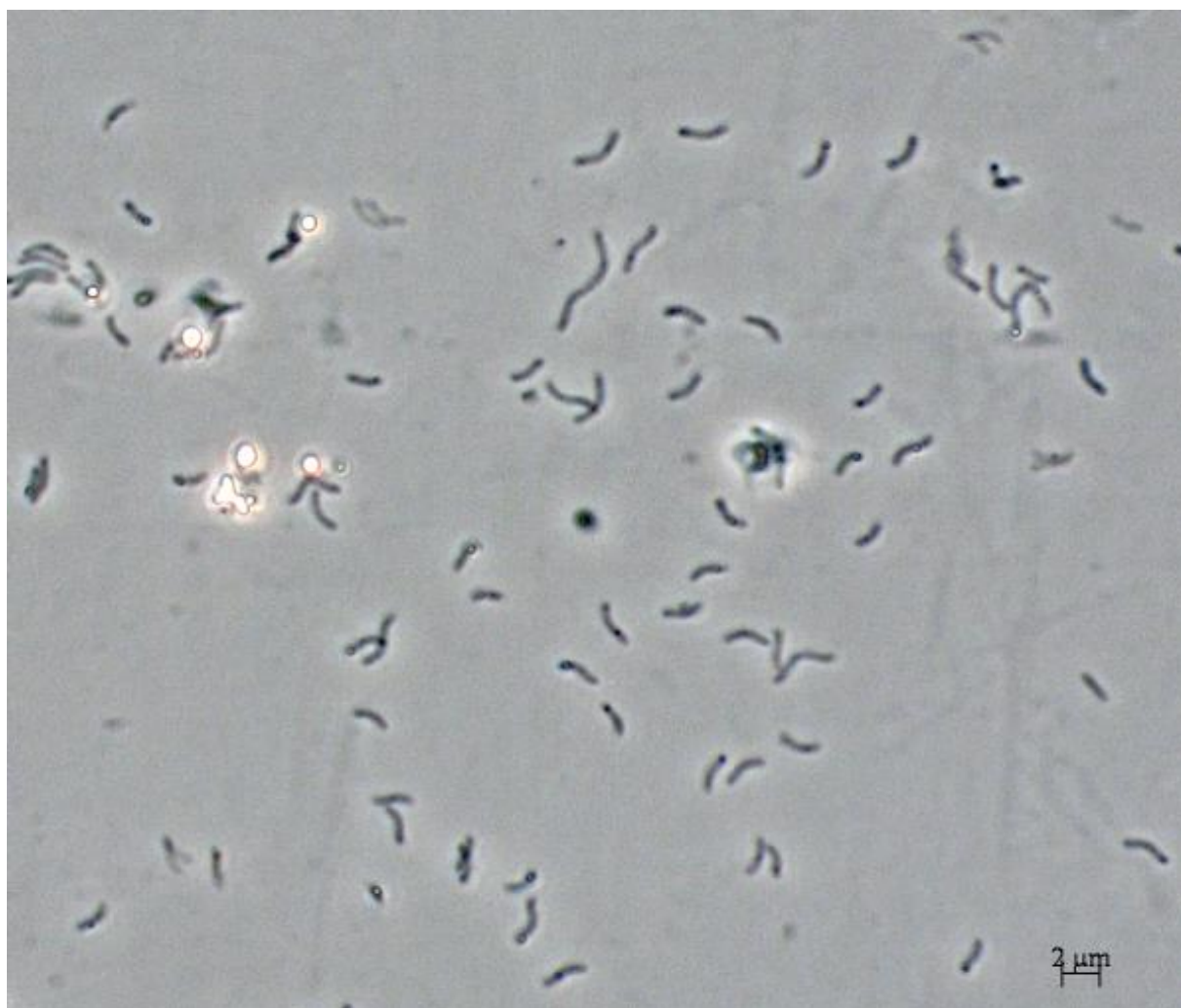


Рисунок 5 – Микрофотография штамма *Desulfovibrio* sp. AY 5 на среде Видделя с добавлением глицерола (фазово-контрастная микроскопия, $\times 1000$).

2.2 Культивирование сульфатредуцирующих бактерий

Культивирование – создание искусственных условий для обеспечения процессов жизнедеятельности и размножения микроорганизмов

В эксперименте использовался метод глубинного непрерывного культивирования бактерий в анаэробных условиях в Биореакторе BIOSTAT-B компании Sartorius stedim biotech и культуральный сосуд с оснащением UniVessel при температуре 37°C.



Рисунок 6 – Биореактор BIOSTAT-B и культуральный сосуд с оснащением UniVessel

Преимущества глубинного непрерывного способа культивирования

- увеличивается количество получаемого продукта за счет увеличения области контакта фаз;
- процесс максимально технологичен – возможность ведения процесса в условиях стерильности, регулируемого pH, pO_2 и состава среды, а также в непрерывном режиме, при котором значительно повышаются экономические показатели;
- удобство выделения целевого продукта из культуральной жидкости.

2.2.1 Приготовление основной питательной среды и добавок к ней

При выращивании СРБ использовали стандартную пресноводную среду Видделя следующего состава (Widdel, Bak, 1992) (Таблица 1)

Таблица 1 – Состав стандартной среды Видделя

мл мг	50	100	150	200	250	300	400	500	600	700	800	1000
Na ₂ SO ₄	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,6	2	2,4	2,8	3,2	4
KH ₂ PO ₄	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,2
NH ₄ Cl	0,012	0,025	0,0375	0,05	0,0625	0,075	0,1	0,125	0,15	0,175	0,2	0,25
NaCl	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	1
MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,16	0,2	0,24	0,28	0,32	0,4
KCl	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,5
CaCl ₂	0,005	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,1

Готовую среду перед посевом кипятили и быстро охлаждали под струей холодной воды для удаления растворенного кислорода. Непосредственно перед посевом в охлажденную до комнатной температуры среду вносили добавки.

- Приготовление раствора микроэлементов (Widdel, Bak, 1992)

В небольшом количестве дистиллированной воды растворяли следующие реактивы:

В расчете на 1л дистиллированной воды вносили:

Вещество	Мг/л
NaCl	12.5
FeSO ₄ ×7H ₂ O	2100
H ₃ BO ₃	30
MnCl ₂ ×4H ₂ O	100
CoCl ₂ ×6H ₂ O	190
NiCl ₂ ×6H ₂ O	24
CuCl ₂ ×2H ₂ O	2

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	144
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	36

- Приготовление раствора витаминов (Widdel, Bak, 1992)

В расчёте на 1 л дистиллированной воды вносили:

натрийфосфатный буфер (pH=7.7)	100 см ³
4-аминобензойная кислота	4 мг
Биотин	1 мг
Никотиновая кислота	10 мг
Кальция пантотенат	10 мг
Пиридоксин дигидрохлорид	15 мг

Цианкобаламин – 1 ампула, содержащая 200 мг/мл цианкобаламина на 1 см³.

- Приготовление раствора $\text{Se}_2\text{O}_3^{2-}$ и WO_4^{2-} (Widdel, Bak, 1992)

В расчёте на 1 литр дистиллированной воды вносили:

NaOH	4 г
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8 мг
$\text{NaSeO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$	6 мг

- Приготовление раствора NaHCO_3

NaHCO_3	0,84 г / 10 мл H_2O
------------------	-------------------------------------

- Приготовление органического субстрата

Глицерол 10 % : 1 миллилитр вещества растворяем 10 мл дист. H_2O

- Приготовление Na_2S

Na_2S 0,48 г / 10 мл H_2O

2.2.2 Внесение добавок в среду Видделя

Алгоритм работы:

1. включить ламинар и тщательно протереть его 70% раствором спирта;
2. приготовить посуду, добавки и среду к стерилизации:
 - А) поставить в протертый ламинар: необходимые добавки, шприцы, вату, спички, перчатки.
 - Б) перевернуть стакан с ватой;
 - В) подготовить спиртовку;
5. закрыть ламинар;
6. стерилизовать ламинар в течение 25-40 минут;
7. поставить среду Видделя на плитку;
8. довести среду до кипения, а затем резко охладить, поставив в холодную воду для выхода оставшегося кислорода;
9. после стерилизации, открыть ламинар и заново включить его;
10. поджечь горелку и работать над ее пламенем;
11. в среду Видделя вносили следующие добавки в последовательности (мл/л основной среды).

Добавки на мл среды	50 мл	100 мл	150 мл	200 мл	300 мл	400 мл
Витамины	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
Микроэлементы	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4
Se/V	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4
Лактат	0.08	0.16	0.24	0.32	0.48	0.64
Прочие субстраты	0.5	1	1.5	2	3	4
Сода	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
Na ₂ S	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8

2.2.3 Приготовление добавок к биореактору

- Раствор соляной кислоты

В качестве добавки к биореактору готовили 1 % раствор соляной кислоты, для поддержания нужного значения pH в реакторе.

Для этого в вытяжном шкафу аккуратно по каплям добавляли 4.1 мл HCl и 146 мл H₂O.

- Раствор гидроксида натрия

Готовили 1 % раствор гидроксида натрия. Для этого 1.5 г NaOH вносили в 150 мл воды и тщательно перемешивали.

- Раствор сульфата железа

Для культивирования штамма была принята конечная концентрация сульфата железа в объеме 100 мг/л. Для этого из расчета на 1 л культивируемой жидкости смешивали 13.9 г сульфата железа с 1 литром H₂O и титровали серной кислотой до приобретения раствором голубоватого оттенка.

Так же для мгновенного поднятия концентрации железа в реакторе добавляли 10 мл H₂O с 0.99 г сульфата железа. (так же из расчета на 1 литр) и титровали серной кислотой до приобретения голубоватого оттенка.

Добавки растворов HCl и NaOH автоклавировали при температуре в 121°C и 1 атмосфере в течении 20 минут.

2.3 Микроскопирование

Для проверки роста и оценки чистоты культуры проводили микроскопирование для контроля выросшей в процессе культивирования культуры. Для этого использовали фазово-контрастную микроскопию. Рассматривали препарат «раздавленная капля», с помощью иммерсионного объектива с увеличением $\times 1000$ раз, пользуясь микроскопом (Axiostan plus, Carl Zeiss). Для приготовления препарата «раздавленная капля» на предметное стекло наносили каплю инокулята с помощью автоматической пипетки, затем накрывали каплю покровным стеклом. Поверх покровного стекла наносили каплю иммерсионного масла (Immersol, Carl Zeiss) и микроскопировали.



Рисунок 7 – ZEISS Axiostar Plus Microscope

(<https://de.dotmed.com/listing/microscope/zeiss/axiostar-plus/893234>)

2.4 Определение числа клеток

Определение численности клеток происходит следующим образом: на предметное стекло с помощью автоматической пипетки наносят 2 мкл культуры и накрывают каплю предметным стеклом размером 18×18 мм. Затем на покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют препарат с помощью иммерсионного объектива с увеличением x1000 раз. Считают клетки в 30-ти полях. Вычисляем численность клеток в 1 мл по следующей формуле:

$$x = n \cdot 113286$$

где x – кол-во клеток на мл, n – среднее значение в 30 полях.

Затем вычисляют среднее число клеток в поле (среднее арифметическое) и стандартное отклонение.

2.5 Осаждение крупных частиц сульфидов металлов

Порядок действий:

- 1) В фалькон наливали 50 мл инокулята и центрифугировали при 5000 обр/мин в течении 15 минут.
- 2) По окончании процесса центрифугирования работали в тяге. В чистый фалькон сливали надосадочную жидкость так, что бы осадок не попал в частый фалькон.
- 3) Фалькон с осадком ставили в термостат с температурой от 50-60 градусов на сутки с открытой крышкой . Далее пробу продували азотом в течении 15-20 минут.

2.6 Определение сероводорода (H₂S) по Пахмайру

Методика: сероводород определяем спектрофотометрически, прежде всего он связывается в виде ZnS. При добавлении очень кислого раствора N, N-диметил-1,4-фенилендиаммонийной соли H₂S освобождается и реагирует с диамином, образуя восстановленную бесцветную форму мителеновой сини, последняя окисляется в голубую форму Fe (III), концентрация которого определяется с помощью спектрофотометра.

Ход определения:

В мерную колбу на 25 мл добавляем 5 мл раствора ацетата цинка. Отбираем по 1 мл пробы и помещаем ее в раствор ацетата цинка, а в контроль пробы не вносим. Добавляем 5мл дистиллированной воды Вносим 2,5 мл диаминового реактива, хорошо перемешиваем. Добавляем 0,125 мл железоаммонийных квасцов, перемешиваем, ставим в теплое темное место на 15 минут.

Через 15 мин доводим объем до 25 мл с помощью дистиллированной воды. Измерение оптической плотности проводим при длине волны 670 нм. Концентрацию рассчитываем, используя калибровочный коэффициент.

Растворы и реактивы:

- Раствор уксуснокислого цинка

Zn(CH₃COO)₂*2H₂O – 24 г

CH₃COOH (20 %) – 1 мл

H₂O дист – доводим до 1 литра

- Диаминовый реактив

H₂O дист. – 600 мл

H₂SO₄ – 200

N, N-диметил-1,4-фенилендиаммоний хлорид – 2 г

H₂O дист. доводим до 1 литра

- Раствор Fe (III)

NH₄Fe(SO₄)*12H₂O –10 г

H₂SO₄ (к) – 2 мл

H₂O дист. – доводим до 1 литра.

2.7 Приготовление посуды для эксперимента

Для образования нерастворимых сульфидов при периодическом культивировании использовали банки на 250 мл. Посуда была вымыта ,высушена , в дальнейшем продута азотной смесью и закупорена резиновой крышкой, а так же зажата металлической. Затем проавтоклавированна при температуре 121 °С в течении 30 минут.

2.8 Методика отбора проб из биореактора

Для изучения физиологических характеристик штамма отбирались несколько проб одновременно. (1) Нулевая отбиралась в 50 мл фалькон до внесения сульфата железа и показывала общее состояние культуры в протоке (*). Изучали количество клеток, количество H₂S и образуемый осадок.

Затем вносили растворенное железо для мгновенного поднятия концентрации до 100 мл/л и подключали перистальтический насос для поддержания постоянного значения . (2) Первая проба отбиралась сразу же после подачи железа и вместе с ней устанавливалась банка на 250 мл в которую с проточной жидкостью собирали культуру клеток для периодического культивирования в термостате.

В течении 8.5 часов культуральную жидкость собиралась в 250 мл банку, затем ее помещали в термостат на 37°С. Далее снимали серию банок на 8/18/24/32/40 суток и (*).



- 1) –банка на 250 мл с инокулятом для периодического культивирования в термостате.
- 2) –блок с перистальтическим насосом.
- 3) –банка с сульфатом железа.
- 4) –биореактор
- 5) –сосуд для фиксации лишнего H₂S

Рисунок 8 – Схема оборудования эксперимента (Фото автора)

2.9 Рентгенодифракционный анализ

Теоретические основы метода (РДА, РФА, РСА, общепринятое обозначение — XRD).

Рентгеноструктурный анализ (рентгенодифракционный анализ) — один из дифракционных методов исследования структуры вещества. В основе данного метода лежит явление дифракции рентгеновских лучей на трехмерной кристаллической решетке.

Явление дифракции рентгеновских лучей на кристаллах открыт Лауэ, теоретическое обоснование явлению дали Вульф и Брэгг (условие Вульфа-Брэгга). Как метод, рентгеноструктурный анализ разработан Дебаем и Шеррером.

Метод позволяет определять атомную структуру вещества, включающую в себя пространственную группу элементарной ячейки, ее размеры и форму, а также определить группу симметрии кристалла.

Рентгеноструктурный анализ и по сей день является самым распространенным методом определения структуры вещества в силу его простоты и относительной дешевизны.

Кристаллическая решетка — это регулярное трехмерное распределение атомов в пространстве, имеющее различную симметрию. Кристаллическая решетка в заданном направлении может рассматриваться как серия параллельных плоскостей, отстоящих друг от друга на расстоянии d . Любое кристаллическое вещество характеризуется определенным набором межплоскостных расстояний d с различными ориентациями плоскостей. Когда монохроматизированный рентгеновский луч с длиной волны l падает на систему кристаллических плоскостей под углом q , дифракция возникает, только если пути, проходимые лучами, отраженными от различных кристаллических плоскостей, различаются на целое число длин волн. Это явление описано законом Брэгга: $n l = 2 d \sin q$.

При изменении угла q , условия закона Брэгга удовлетворяются поочередно для различных систем плоскостей в поликристаллическом материале, в результате чего, на дифрактограмме исследуемого вещества последовательно, с изменением угла, появляются рентгеновские рефлексы — пики (линии дифрактограммы) с явным максимумом. Координаты и высота пиков характеризуют исследуемое вещество. Эти данные передаются в программное обеспечение, где обрабатываются в зависимости от вида исследований.

Принципиальная схема дифрактометра Брег-Брентано показана на Рисунке 9.

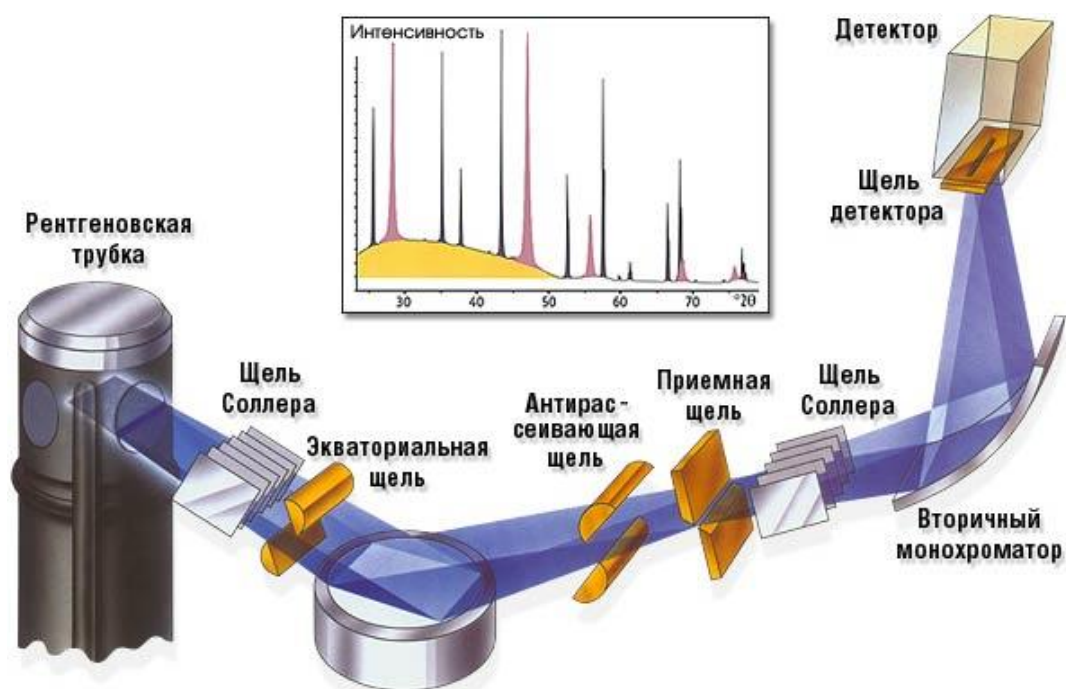


Рисунок 9 – Главные компоненты дифрактометра – рентгеновская трубка и детектор

Они размещаются на гониометре (система точной установки и отслеживания угла излучения по отношению к поверхности образца). Одно плечо гониометра задает угол облучения образца рентгеновской трубкой, другое определяет угол брэгговского отражения излучения от образца (т.е. детектируемый сигнал). Детектор во время движения (при изменении угла θ) непрерывно регистрирует интенсивность рентгеновского излучения. Остальные части оптической схемы дифрактометра придают излучению такие свойства, чтобы оптимизировать его для решения тех или иных задач дифрактометрических исследований.

Идентификация и количественное определение фаз (фазовый анализ)

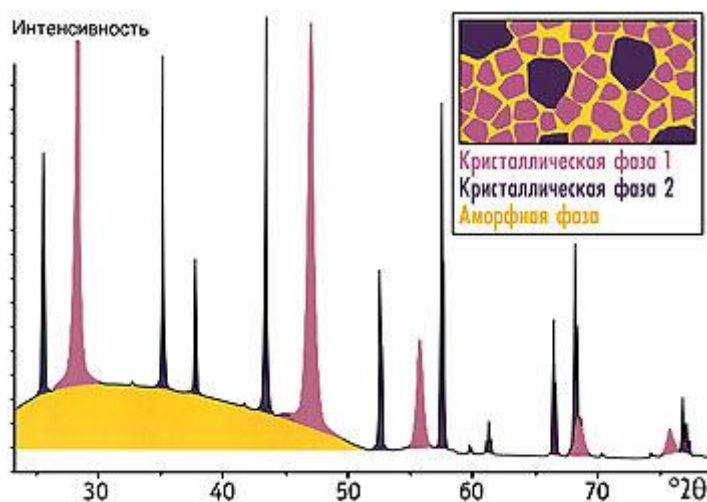


Рисунок 10 – Пример дифрактограммы

Наиболее распространенный вид дифрактометрических исследований — идентификация фаз и количественный анализ фазового состава образца. На рисунке показана типичная дифрактограмма образца: состоит из двух кристаллических фаз с разными размерами кристаллитов и аморфной фазы.

Каждой фазе образца соответствуют свои пики дифракции рентгеновского излучения (показаны различными цветами). Остроконечные пики получены от кристаллических фаз образца, а нелинейный фон — от аморфной фазы.

Дифрактограмма содержит пики от всех фаз образца независимо от их числа. По положению пиков дифрактограммы определяют, какие кристаллические фазы присутствуют в образце т.е. происходит идентификация фаз.

Идентификация достигается путем нахождения в базе данных таких же рентгеновских пиков, как на дифрактограмме исследуемого образца. По высоте (интенсивности) пиков производят количественный анализ кристаллических фаз, то есть определяют концентрацию каждой кристаллической фазы образца. По интенсивности нелинейного фона определяют суммарное содержание аморфных фаз.

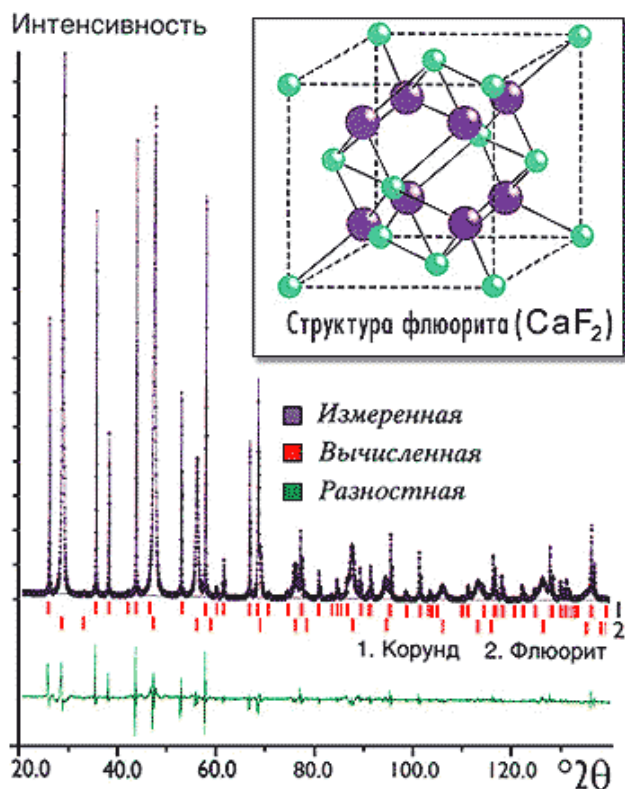


Рисунок 11 – Пример №2 дифрактограммы

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Полученные данные свидетельствуют об образовании двух видов сульфидов железа, таких как пирит (FeS_2) и грейгит (Fe_3S_4) (Приложение 1). Сульфиды были обнаружены в пробах образцов культивируемых на значениях pH от 7 до 5 единиц включительно. В пробах, полученных из образцов культивированных на значениях pH ниже 5 содержание сульфидов не наблюдалось, либо их количество было ниже детектируемого значения. Вероятно, это связано с низкой биомассой культуры, а также низким показателем кислотности pH (приложения №1)

Наибольшее среднее значение продуцируемого сероводорода (H_2S), при культивировании в биореакторе, было зафиксировано на значении pH равном 7 и равнялось 57,78 мг/л (Приложение №2)

Наибольшее среднее значение клеток, при периодическом культивировании наблюдалось на значении pH равном 6.5, т. к. является оптимумом для жизнедеятельности данного вида бактерий, и равнялось 6,030345 Log клеток см^3 (Приложение №2).

Так же дифрактограммы приложения №1 позволяют сделать вывод о лучшей кристаллизации образцов, культивировавшихся в переодических условиях т.к. видны отчетливые пики на диффрактограме. Высота пика свидетельствует о высокой кристаллизации образца.

ВЫВОДЫ

1. Получены биогенные сульфиды железа, образованные *Desulfovibrio* sp. AY 5 в условиях непрерывного культивирования, а также при периодическом культивировании на разных значениях pH. Отмечено, что на значениях pH ниже 5, сульфиды не обнаружены.
2. Изучен минералогический состав образованных сульфидов железа. Данные свидетельствуют о присутствии двух соединений сульфидов железа, таких как грейгит (Fe_3S_4) и пирит (FeS_2).
3. Определено количество продуцируемого H_2S *Desulfovibrio* sp. AY 5, а также подсчитано количество клеток на разных значениях pH. Максимальное значение количества клеток наблюдалось на значениях $\text{pH} = 6.5$. Максимальное значение концентрации H_2S в мг/л наблюдалось на $\text{pH} = 7$

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams J. B. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism-comparisons to typical children and correlation / J. B. Adams [et al.] // BMC Gastroenterol. – 2011. – Vol. 11 (1):22. – P. 11-22.
2. Alazard, Dukan, Urios, Verhé, Bouabida, Morel, Ollivier. "*Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents". – 2003. P. 173-178.
3. Carbonero, F., Benefiel A. C., Alizadeh-Ghamsari, A. H., and Gaskins H. R. (2012) Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease. *Front Physiol* 28;3: 448. doi: 10.3389/fphys.2012.00448
4. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders.
5. Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: a translational hypothesis for regressive autism pathogenesis.
6. Evaluation of Periodic Limb Movements in Sleep and Iron Status in Children with Autism, Rebecca Lane, *Pediatr Neurol*. 2015 October; 53(4): 343–349. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2015.06.014.
7. Finegold S. M., Dowd S. E., Gontcharova V., Liu C., Henley K. E., Wolcott R. D., et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 2010; 16:444–53.
8. Finegold S. M., Downes J., Summanen P.H. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe* 2012; 18:260–2.
9. Fischbach M. A., Sonnenburg J.L. Eating for two: How metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host Microbe*. 2011;10(4):336–347. [PMC free article] [PubMed] 5(6):419–27.
10. Gondalia S. V., Palombo E. A., Knowles S. R., Cox S. B., Meyer D., Austin D. W. Molecular characterization of gastrointestinal microbiota of children (with and without gastrointestinal dysfunction) and their neurotypical siblings. *Autism Res* 2012;
11. Hornig M., Brieseman T., Buie T., Bauman M. L., Lauwers G., Siemietzki U., et al. Lack of association between measles virus vaccine and autism with enteropathy: a case-control study. *PLoS ONE* 2008; 3(9). e3140.
12. <https://lab-solutions.ru/information/xrd/>

13. Ishimoto M., Koyama J. & Nagai Y. (1954). Role of a cytochrome in thiosulphate reduction by a sulphate reducing bacterium. *Seikagaku Zasshi* 26, 303.
14. Isolation and characterization of an anaerobic sulfidogenic *Tissierella* bacterium from Cu-bearing coins/ Polina A. Bukhtiyarova Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Tomsk State University, Tomsk, Russia;
15. Kimura H. (2010) Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxid Redox Signal* 12: 1111–1123. doi: 10.1089/ars.2009.2919
16. Kinney DK, Munir KM, Crowley DJ, Miller AM (2008). “Prenatal stress and risk for autism”. *Neurosci Biobehav Rev.* 32(8): 1519-32. DOI:10.1016/j.neubiorev.2008.06.004. PMID 18598714.
17. Linden D. R., Levitt M. D., Farrugia G. and Szurszewski J. H. (2010) Endogenous production of H₂S in the gastrointestinal tract: still in search of a physiologic function. *Antioxid Redox Signal* 12: 1135–1146. doi: 10.1089/ars.2009.2885
18. Loubinoux J., Bronowicki J-P., Pereira I. A. C., Mouguel J-L., and Faou A. E. (2002) Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecol* 40: 107–112. doi: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00942.x
19. Moore W. E. C., Johnson J. L. and Holdeman L. V. (1976). Emendation of Bacteroidaceae and Butyrivibrio and descriptions of Desulfomonas gen. nov. and ten new species of the genera Desulfomonas, Butyrivibrio, Eubacterium, Clostridium and Ruminococcus. *Int. J. Syst. Bact.*, 26, 238_52.
20. Muyzer G. and Stams A. J. (June 2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6: 441–454.
21. Postgate J. R. (1954). Presence of cytochrome in an obligate anaerobe. *Biochemical Journal* 56, xi.
22. Postgate J. R. (1984). *The Sulphate-reducing Bacteria*, 2nd edn. Cambridge : Cambridge University Press.
23. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children
24. Rabus R. *Dissimilatory Sulfate – and Sulfur – Reducing Prokaryotes* / R. Rabus, T. A. Hansen, F. Widdel // Springer – Verlag Berlin Heidelberg – 2013.
25. Song Y., Liu C., Finegold S. M. Real-time PCR quantitation of Clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(11):6459–65.
26. *Sulphate-reducing Bacteria \Environmental and Engineered Systems* Edited By Larry L. Barton /W. Allan Hamilton
27. Sydney M. Finegold et al. *Molecular biology, genetics and biotechnology*.
28. Wang, J. L. (2010) Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the

digestive tract. *Antioxid Redox Signal* 12: 1125-1133.

29. Widdel F., Bak F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows A, Truper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H. (eds) *The prokaryotes*, vol 3, 2nd edn. Springer, New York, pp 3352–3378 with autism severity. *BMC Gastroenterol* 2011;11:22.

30. Zinkevich, V., and Beech, I. B. (2000) Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiol Ecol* 34: 147–155.

31. Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология. — М.: Изд-во МГУ, 2004. — 448 с. стр.: 388-393

32. Как проявляются симптомы расстройств аутистического спектра (РАС) у детей раннего возраста. Пособие для родителей, семьи и друзей. Москва. Фонд «Выход», 2014.— 36с.

33. Кишечная микробиота [Электронный ресурс] // URL: <http://www.gutmicrobiotaforhealth.com/en/about-gut-microbiota-info/> дата обращения (16.04.2018)

34. Материалы Научно-Практической Конференции Центрального Федерального Округа Российской Федерации С Международным Участием «Стоматологические И Соматические Заболевания У Детей: Этиопатогенетические Аспекты Их Взаимосвязей, Особенности Профилактики, Диагностики И Лечения»

35. ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ/ Кафедра общей биологии/А.Д. Буракаева А.М. Русанов В.П. Лантух / Методическое пособие «Роль микроорганизмов в очистке сточных вод от тяжелых металлов» Оренбург 1999 ст .7

36. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах / Под ред. Й. Ленглера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. — М.: Мир, 2005. - стр.: 363-368

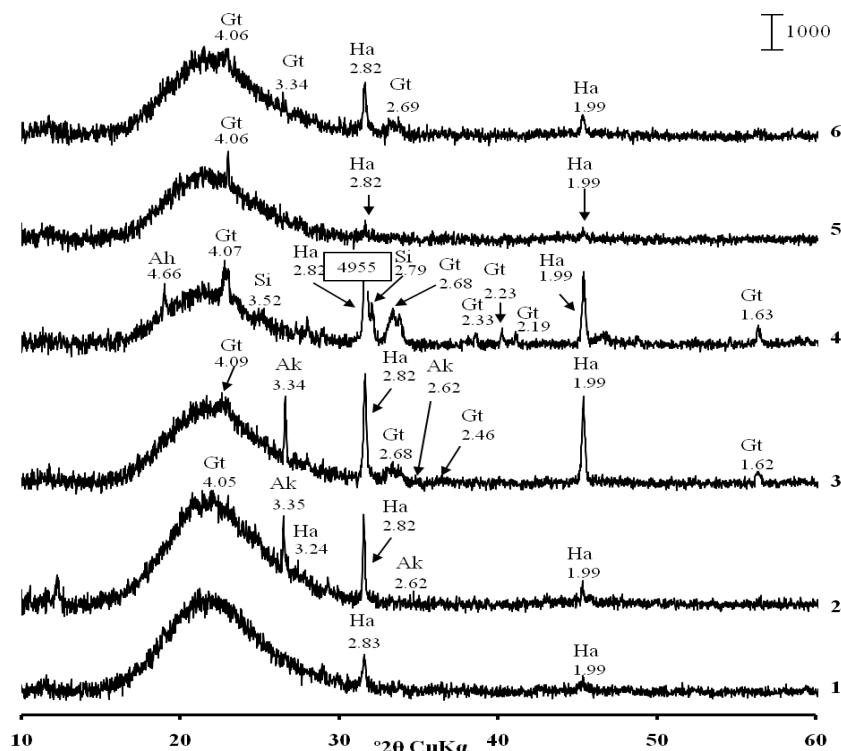
37. Чурикова В. В., Викторов Д. П. Основы микробиологии и вирусологии. Воронеж: ВГУ, 1994. 280 с.

38. Шапошникова Л. И. МИКРОБИОТА ЧЕЛОВЕКА КАК ОСНОВНОЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ОРГАН // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 9. – С. 80-82;

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Дифрактограммы осадков, образованных в ферментере штаммом АУ5 при непрерывном культивировании в протоке



Образец 820-825 – Дифрактограмма осадков, образованных в ферментере штаммом АУ5 при непрерывном культивировании в протоке при pH 4,

1 – без добавления Fe^{2+} ,

2 – сразу после добавления в проток $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$,

3 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 1 суток,

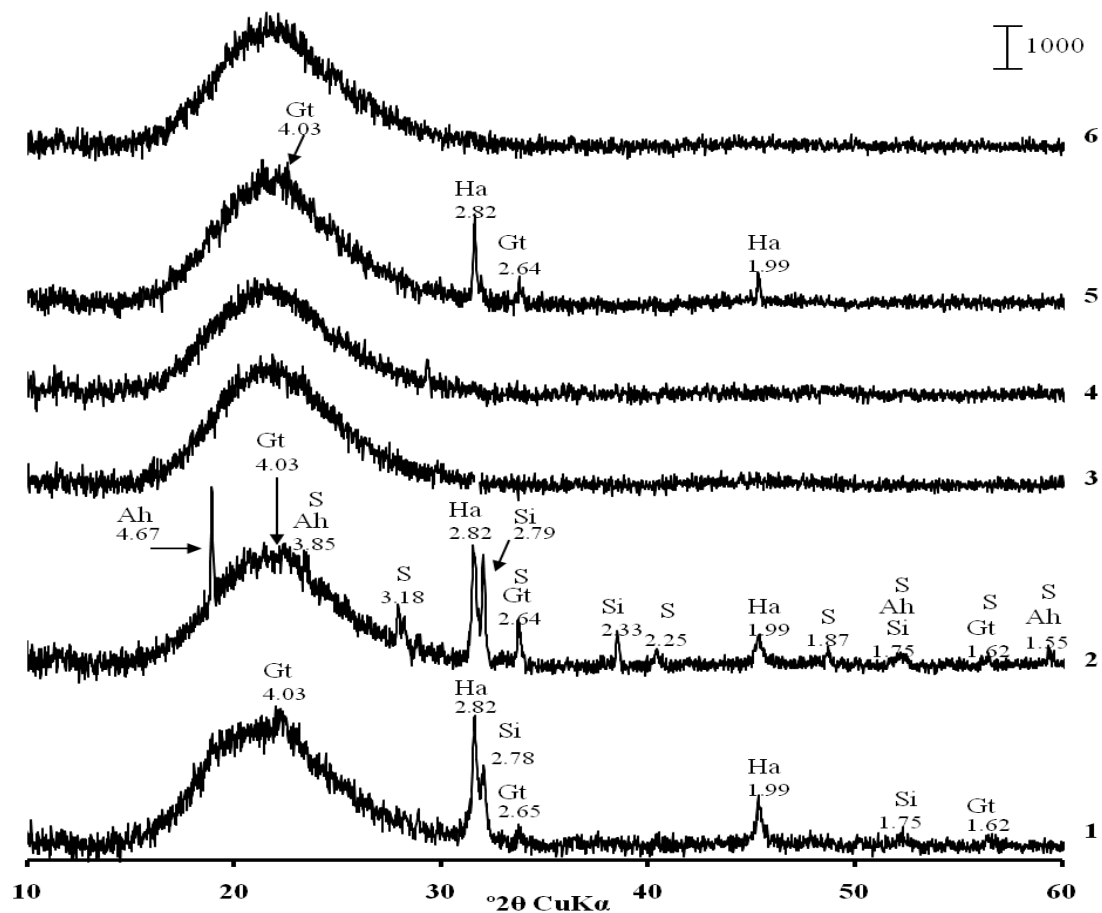
4 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 4 суток,

5 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 6 суток,

6 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 8 суток.

Обозначения на дифрактограмме:

Gt	Гетит	Iron Oxide Hydroxide, Geothite	$\text{Fe}^{+3}\text{O}(\text{OH})$	03-0251
Ha	Галит	Halite	NaCl	05-0628
Ak	Акагенит	Akaganeite-Q	$\text{Fe}^{+3}\text{O}(\text{OH})$	00-034-1266
Ah	Ангидрит	Calcium Sulfate, Anhydrite	CaSO_4	03-0162
Si	Сидерит	Siderite, Iron Carbonate	FeCO_3	03-0746



Образец 803-805,808,810,811 – Дифрактограмма осадков, образованных в ферментере штаммом АУ5 при непрерывном культивировании в протоке при рН 4.5,

1 – без добавления Fe^{2+} ,

2 – сразу после добавления в проток $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$,

3 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 1 суток,

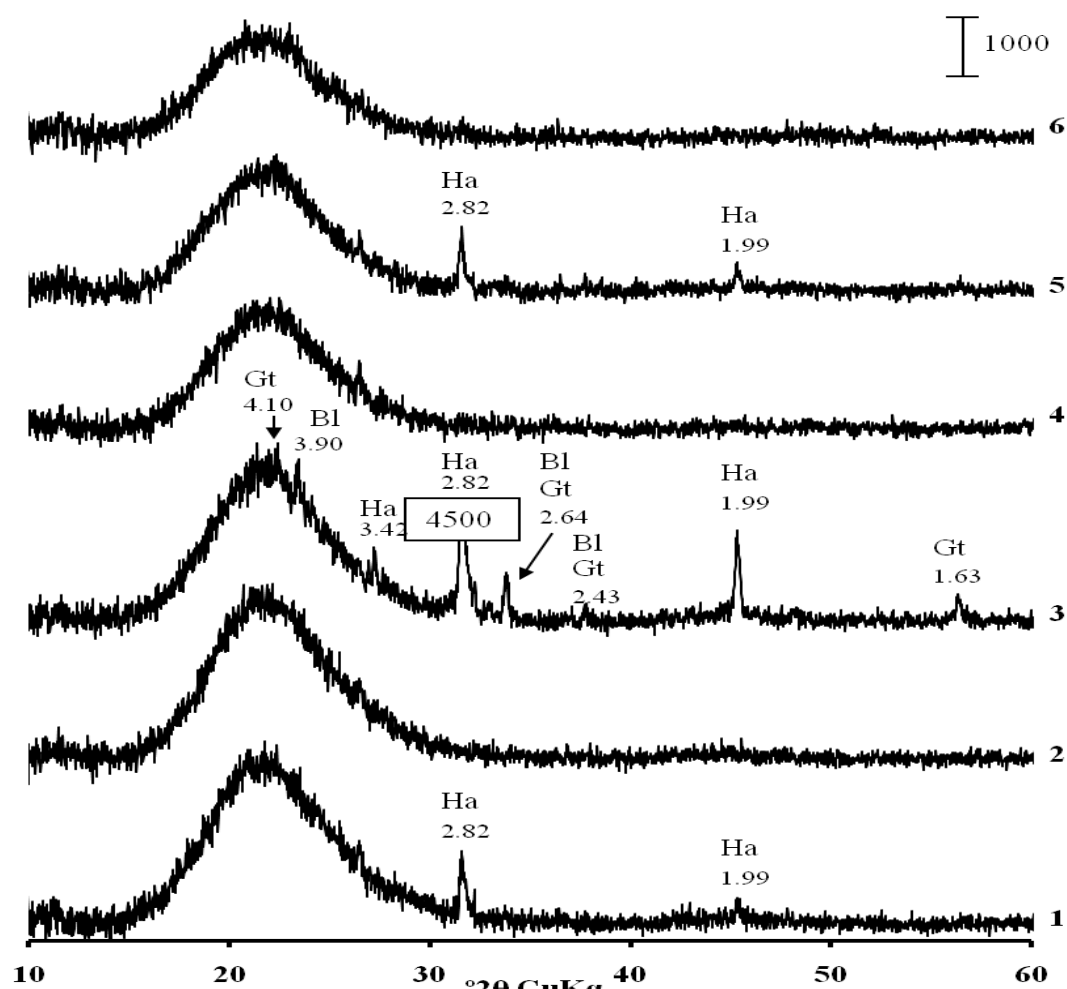
4 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 2 суток,

5 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 3 суток,

6 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 4 суток.

Обозначения на дифрактограмме:

S	Кристаллическая	Sulfur (brimstone)	S	08-0248
Ha	Галит	Halite	NaCl	05-0628
Bl	Берналит	Bernalite	$\text{Fe}^{3+}(\text{OH})_3$	46-1436
Ah	Ангидрит	Calcium Sulfate, Anhydrite	CaSO_4	03-0162
Si	Сидерит	Siderite, Iron Carbonate	FeCO_3	03-0746



Образец 795-800 – Дифрактограмма осадков, образованных в ферментере штаммом АУ5 при непрерывном культивировании в потоке при pH 5,

1 – без добавления Fe^{2+} ,

2 – сразу после добавления в поток $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$,

3 – после культивирования в потоке с $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 1 суток,

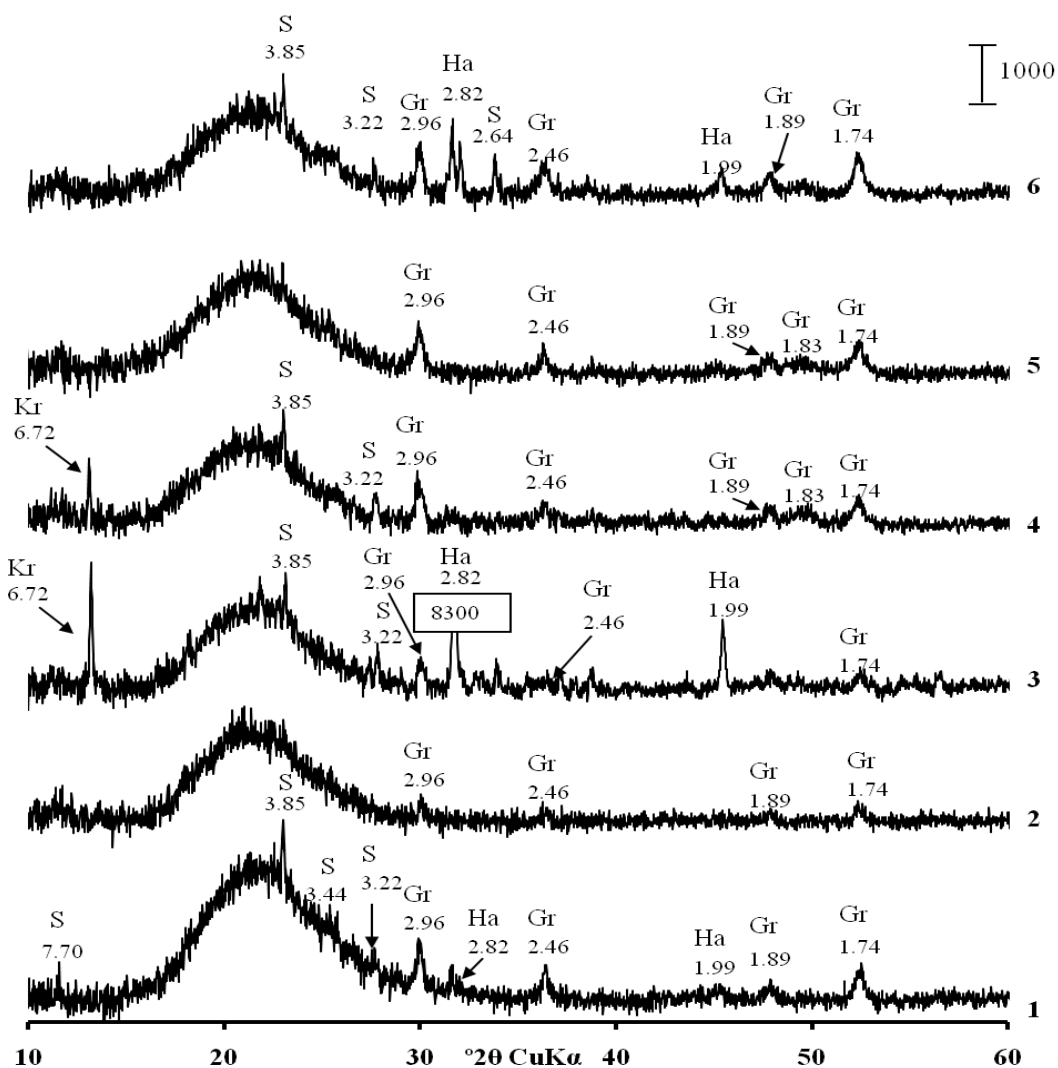
4 – после культивирования в потоке с $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 2 суток,

5 – после культивирования в потоке с $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 3 суток,

6 – после культивирования в потоке с $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 4 суток.

Обозначения на дифрактограмме:

Ha	Галит	Halite	NaCl	05-0628
Bl	Берналит	Bernalite	$\text{Fe}^{3+}(\text{OH})_3$	46-1436
Gt	Гетит	Iron Oxide Hydroxide, Geothite	$\text{Fe}^{+3}\text{O}(\text{OH})$	03-0251



Образец 772-777 – Дифрактограмма осадков, образованных в ферментере штаммом AY5 при непрерывном культивировании в потоке при pH 5,5,

1 – без добавления Fe^{2+} ,

2 – сразу после добавления в проток $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$,

3 – после культивирования в потоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 1 суток,

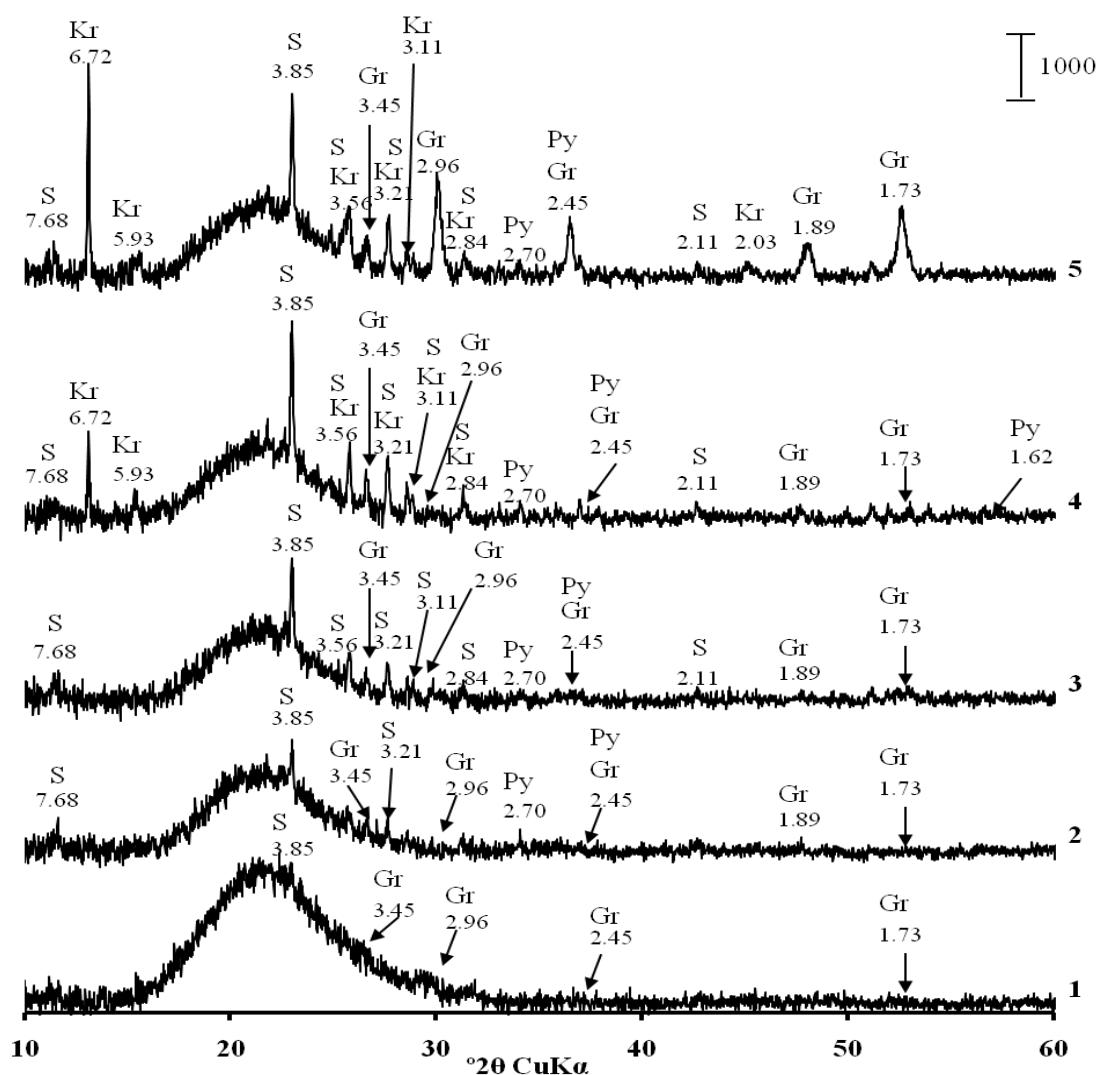
4 – после культивирования в потоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 2 суток,

5 – после культивирования в потоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 3 суток,

6 – после культивирования в потоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 4 суток.

Обозначения на дифрактограмме:

Kr	Корнелит	Iron Sulfate Hydrate,	$\text{Fe}_2+3(\text{SO}_4)_3*7\text{H}_2\text{O}$	44-1426
S	Кристаллическая	Sulfur (brimstone)	S	08-0248
Ha	Галит	Halite	NaCl	05-0628
Gr	Грейгит	Greigite	Fe_3S_4	16-0713



Образец 745-749 – Дифрактограмма осадков, образованных в ферментере штаммом AY5 при непрерывном культивировании в протоке при pH 6,

1 – без добавления Fe^{2+} ,

2 – сразу после добавления в проток $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$,

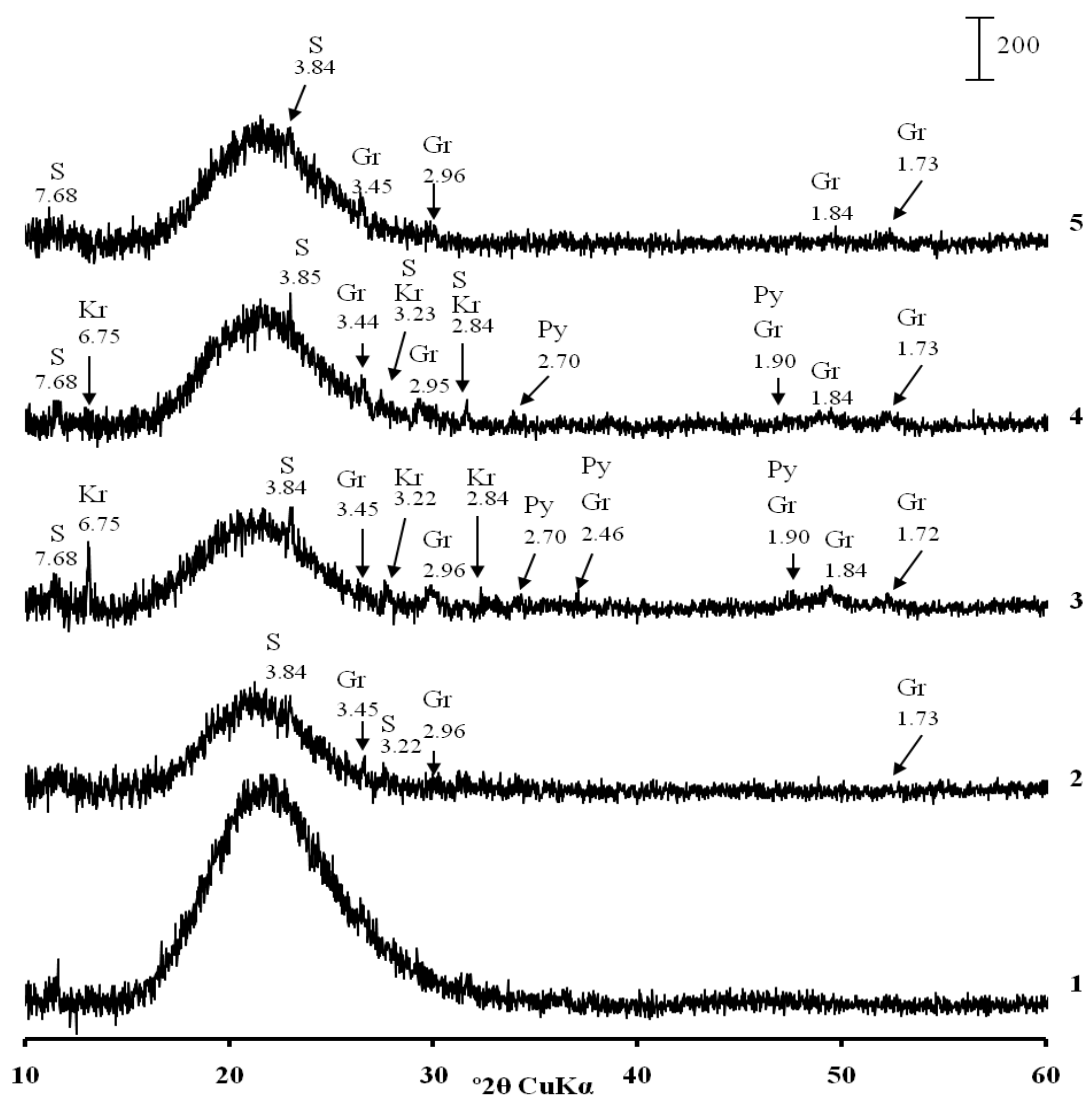
3 – после культивирования в протоке с $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 2 суток,

4 – после культивирования в протоке с $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 3 суток,

5 – после культивирования в протоке с $100 \text{ mgFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 4 суток.

Обозначения на дифрактограмме:

Kr	Корнелит	Iron Sulfate Hydrate, Kornelite	$\text{Fe}_2+3(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44-1426
Py	Пирит	Pyrite, Iron Sulfide	FeS_2	42-1340
S	Кристаллическая сера	Sulfur (brimstone)	S	08-0248
Gr	Грейгит	Greigite	Fe_3S_4	16-0713



Образец 729-733 – Дифрактограмма осадков, образованных в ферментере штаммом AY5 при непрерывном культивировании в протоке при pH 6,5,

1 – без добавления Fe^{2+} ,

2 – сразу после добавления в проток $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$,

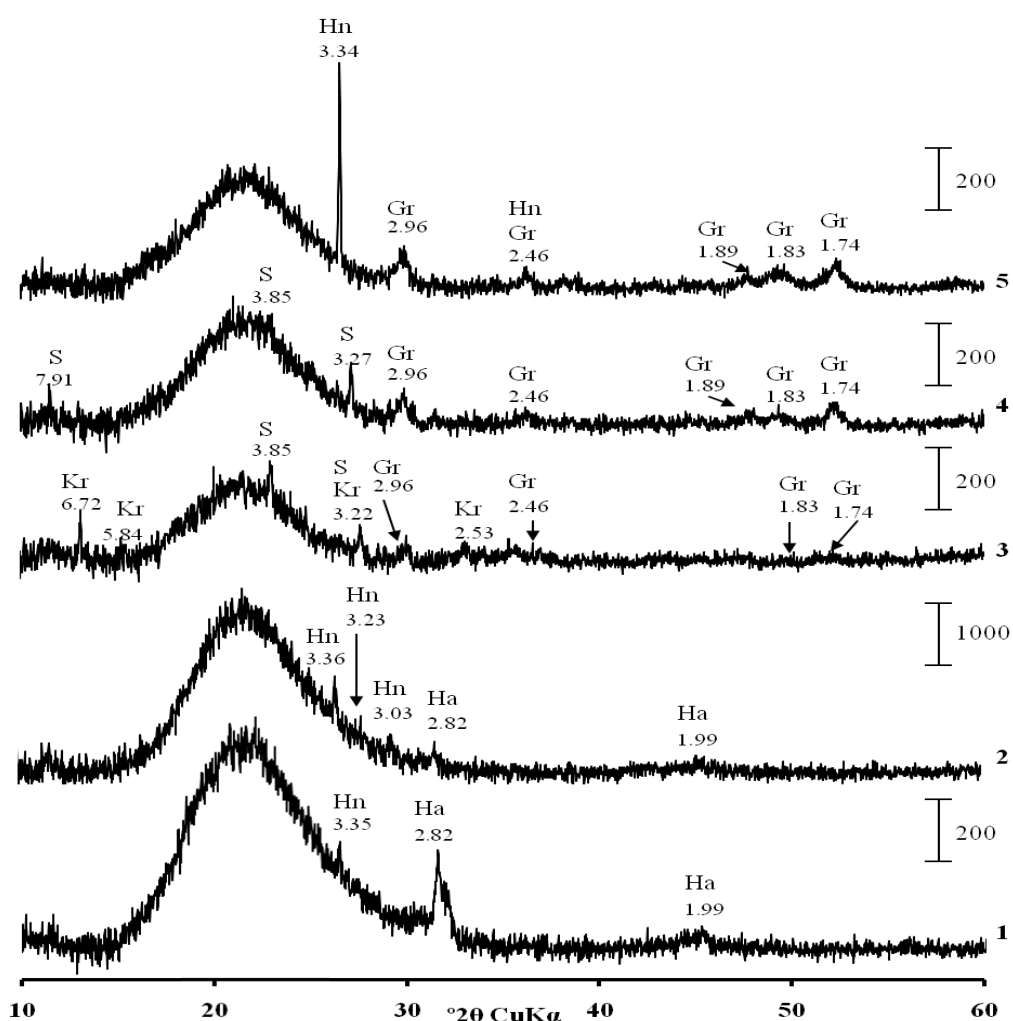
3 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 2 суток,

4 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 4 суток,

5 – после культивирования в протоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 5 суток.

Обозначения на дифрактограмме:

Kr	Корнелит	Iron Sulfate Hydrate,	$\text{Fe}_2+3(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44-1426
Gr	Грейгит	Greigite	Fe_3S_4	16-0713
Py	Пирит	Pyrite, Iron Sulfide	FeS_2	42-1340
S	Кристаллическая сера	Sulfur (brimstone)	S	08-0248



Образец 734,753,725,735,736 – Дифрактограмма осадков, образованных в ферментере штаммом АУ5 при непрерывном культивировании в потоке при pH 7,

1 – без добавления Fe^{2+} ,

2 – сразу после добавления в поток $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$,

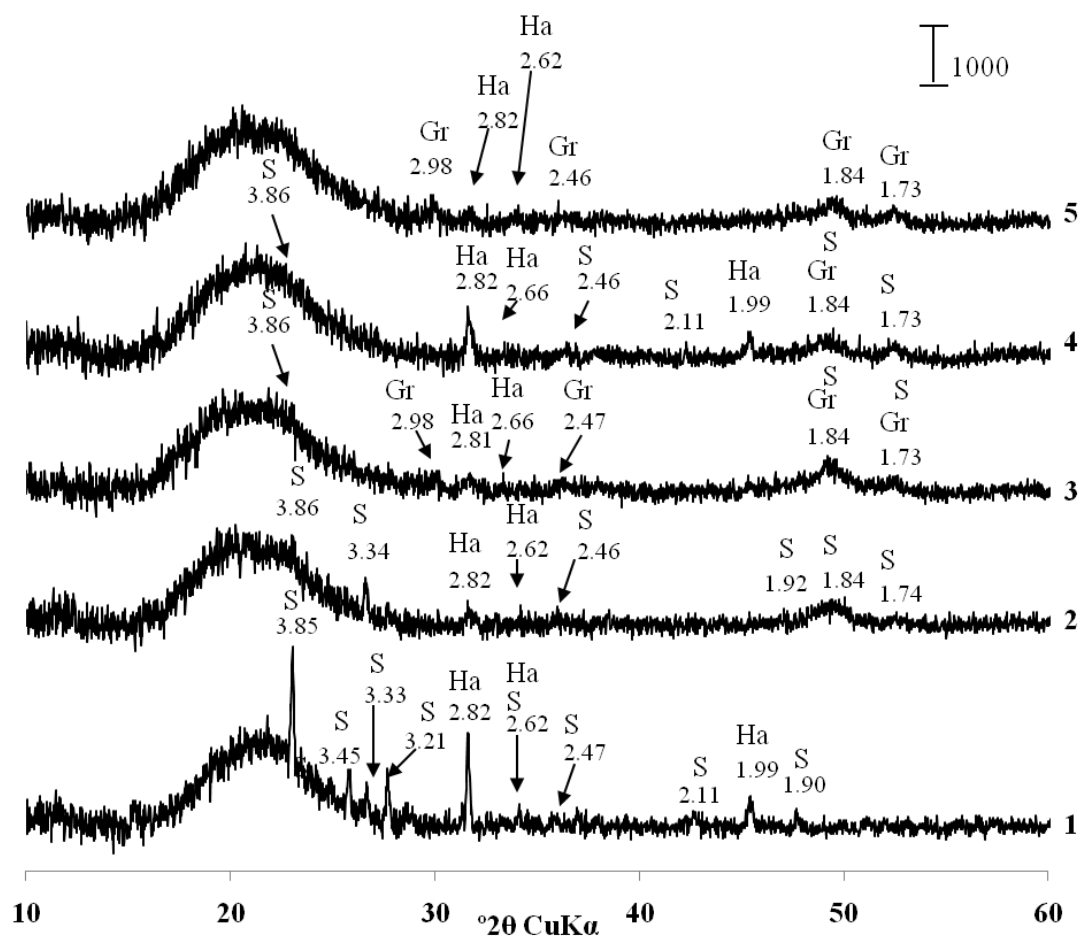
3 – после культивирования в потоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 2 суток,

4 – после культивирования в потоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 3 суток,

5 – после культивирования в потоке с $100 \text{ мгFe}^{2+}/\text{л}$ в течении 5 суток.

Обозначения на дифрактограмме:

Kr	Корнелит	Iron Sulfate Hydrate,	$\text{Fe}_2+3(\text{SO}_4)_3*7\text{H}_2\text{O}$	44-1426
Ha	Галит	Halite	NaCl	05-0628
Hn	Хентшелит	Copper Iron Phosphate Hydroxide, Hentschelite	$\text{CuFe}_2(\text{PO}_4)_2*(\text{OH})_2$	78-1104
S	Кристаллическая сера	Sulfur (brimstone)	S	08-0248
Gr	Грейгит	Greigite	Fe_3S_4	00-016-0713

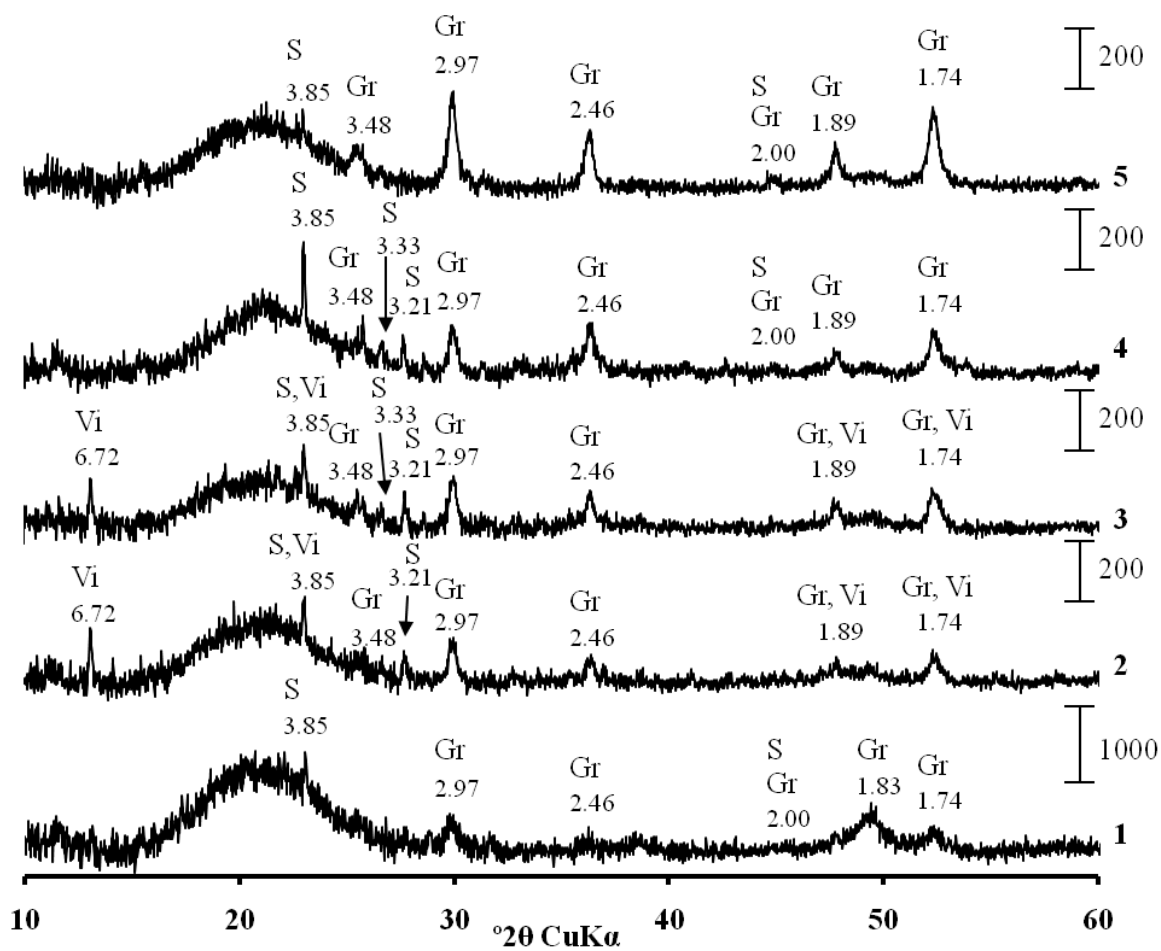


Образец 801,809,812,818,819 – Дифрактограмма осадков, образованных в бутылке на 250 мл после отбора из ферментера штаммом AY5 в присутствии 100 мгFe²⁺/л при pH 5 в течении:

- 1 – 8 суток,
- 2 – 18 суток,
- 3 – 24 суток,
- 4 – 32 суток.
- 5 – 40 суток

Обозначения на дифрактограмме:

Vi	Вивианит	Vivianite	Fe ₃ (PO ₄) ₂ ·8H ₂ O	30-0662
S	Кристаллическая сера	Sulfur (brimstone)	S	08-0248
Gr	Грейгит	Greigite	Fe ₃ S ₄	16-0713

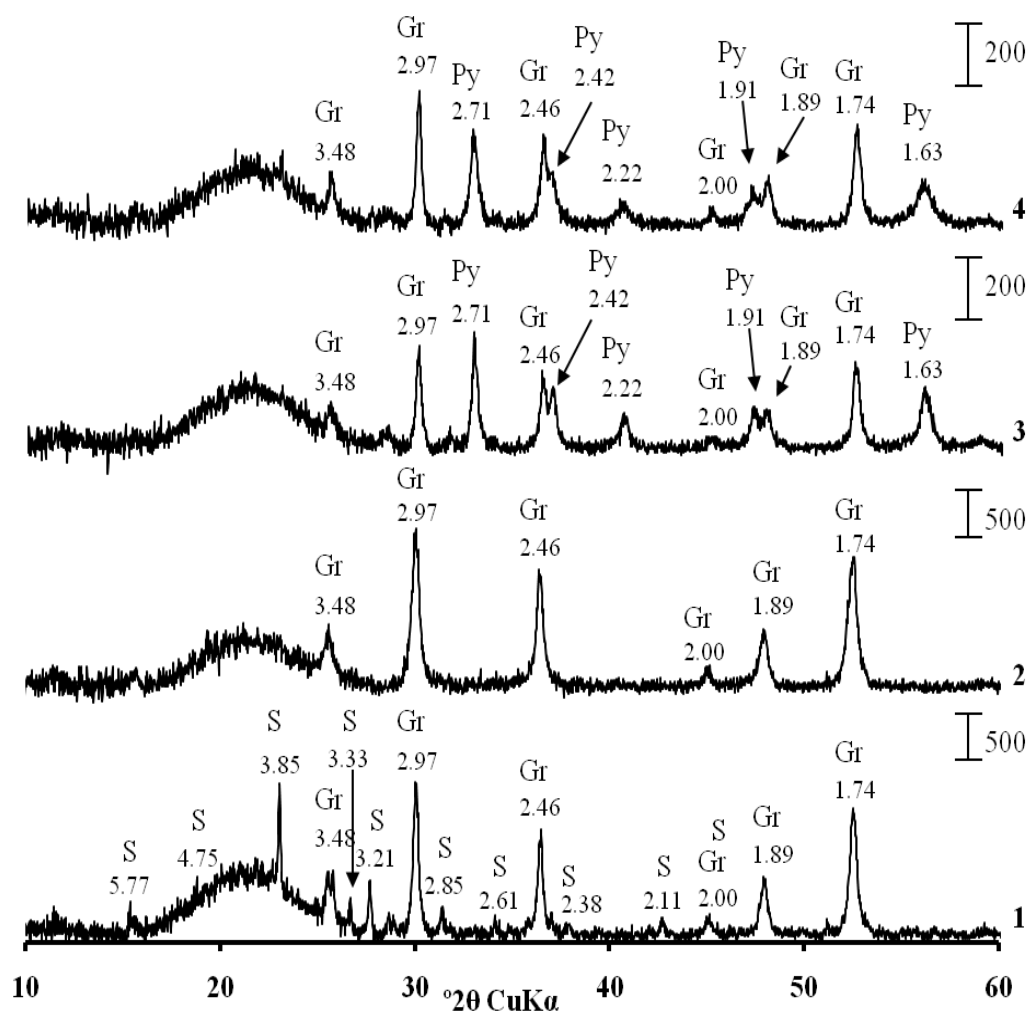


Образец 780,790,791,793,794 – Дифрактограмма осадков, образованных в бутылке на 250 мл после отбора из ферментера штаммом АУ5 в присутствии 100 мгFe²⁺/л при pH 5,5 в течении:

- 1 – 8 суток,
- 2 – 18 суток,
- 3 – 24 суток,
- 4 – 32 суток.
- 5 – 40 суток

Обозначения на дифрактограмме:

Vi	Вивианит	Vivianite	Fe ₃ (PO ₄) ₂ *8H ₂ O	30-0662
S	Кристаллическая сера	Sulfur (brimstone)	S	08-0248
Gr	Грейгит	Greigite	Fe ₃ S ₄	16-0713

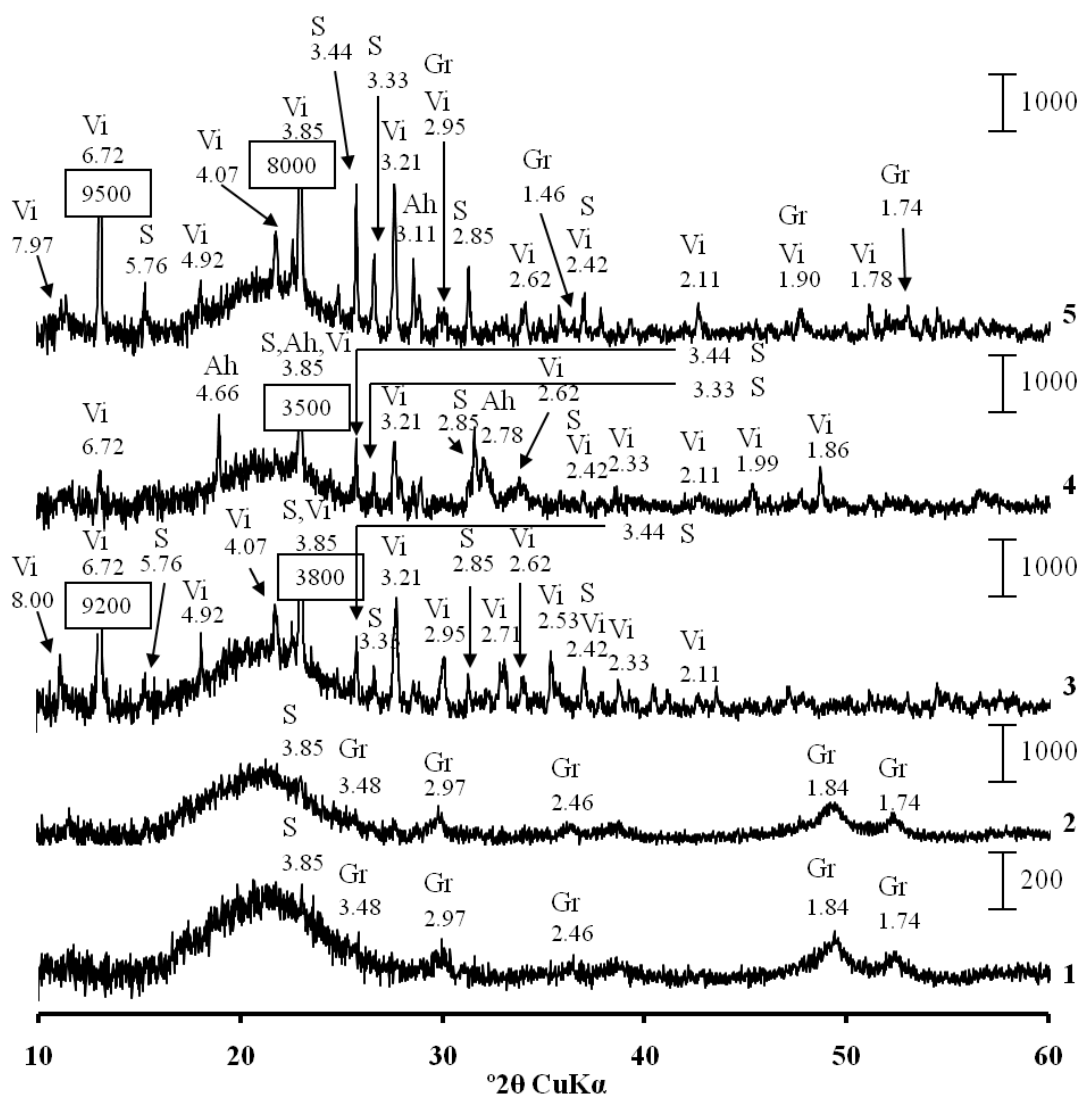


Образец 752,778,789,792 – Дифрактограмма осадков, образованных в бутылке на 250 мл после отбора из ферментера штаммом АУ5 в присутствии 100 мгFe²⁺/л при рН 6 в течении:

- 1 – 8 суток,
- 2 – 24 суток,
- 3 – 32 суток,
- 4 – 40 суток.

Обозначения на дифрактограмме:

Py	Пирит	Pyrite, Iron Sulfide	FeS ₂	42-1340
S	Кристаллическая сера	Sulfur (brimstone)	S	08-0248
Gr	Грейгит	Greigite	Fe ₃ S ₄	16-0713

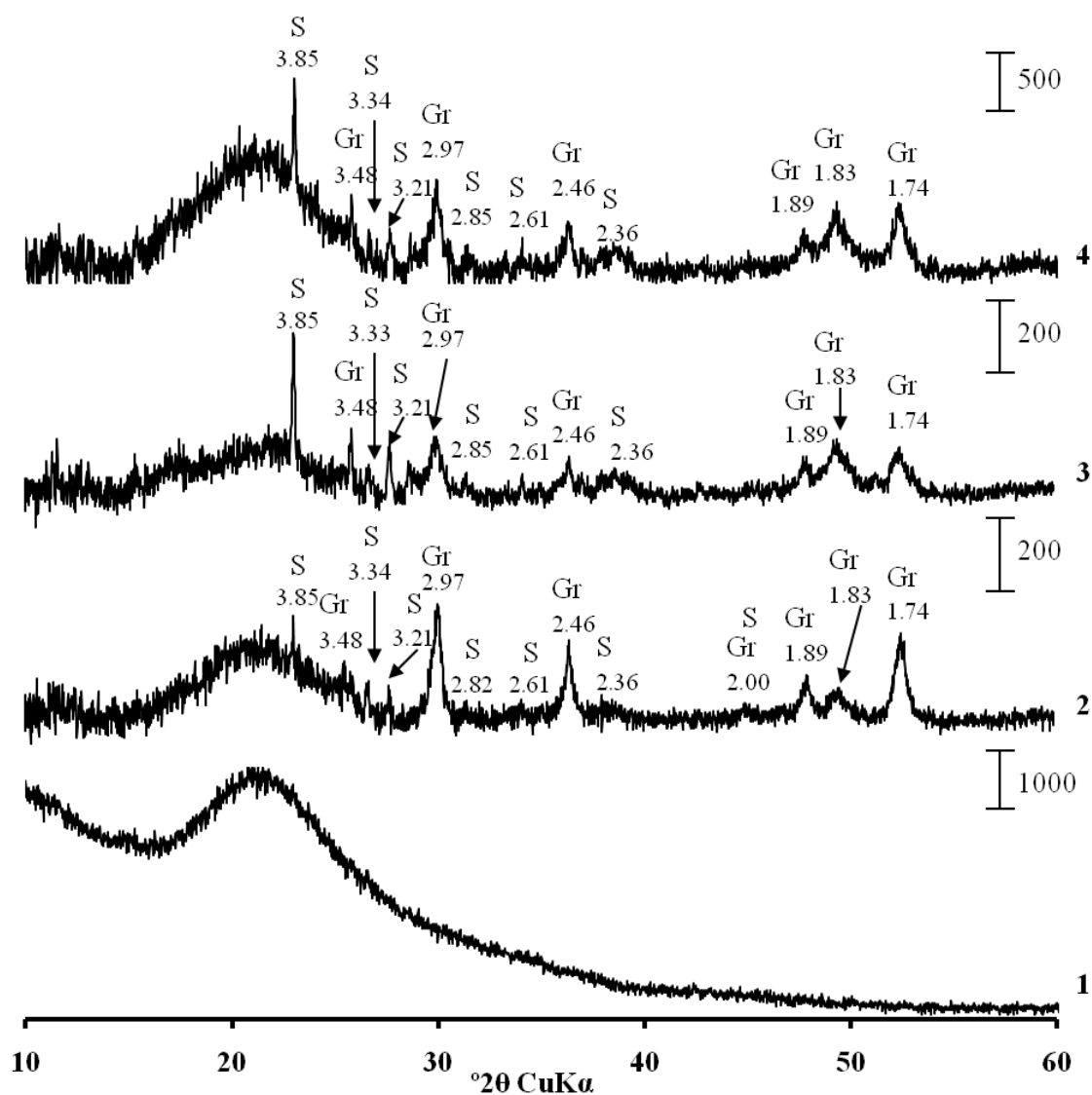


Образец 741,751,770,771,779 – Дифрактограмма осадков, образованных в бутылке на 250 мл после отбора из ферментера штаммом AY5 в присутствии 100 мгFe²⁺/л при pH 6,5 в течении:

- 1 – 8 суток,
- 2 – 18 суток,
- 3 – 24 суток,
- 4 – 32 суток.
- 5 – 40 суток

Обозначения на дифрактограмме:

Ah	Ангидрит	Calcium Sulfate, Anhydrite	CaSO ₄	03-0162
Rd	Родоликоит	Iron Phosphate, Rodolicoite	FePO ₄	29-0715
Vi	Вивианит	Vivianite	Fe ₃ (PO ₄) ₂ *8H ₂ O	30-0662
Gr	Грейгит	Greigite	Fe ₃ S ₄	16-0713



Образец 724,726,737,744 – Дифрактограмма осадков, образованных в бутылке на 250 мл после отбора из ферментера штаммом АУ5 в присутствии 100 мгFe²⁺/л при pH 7 в течении:

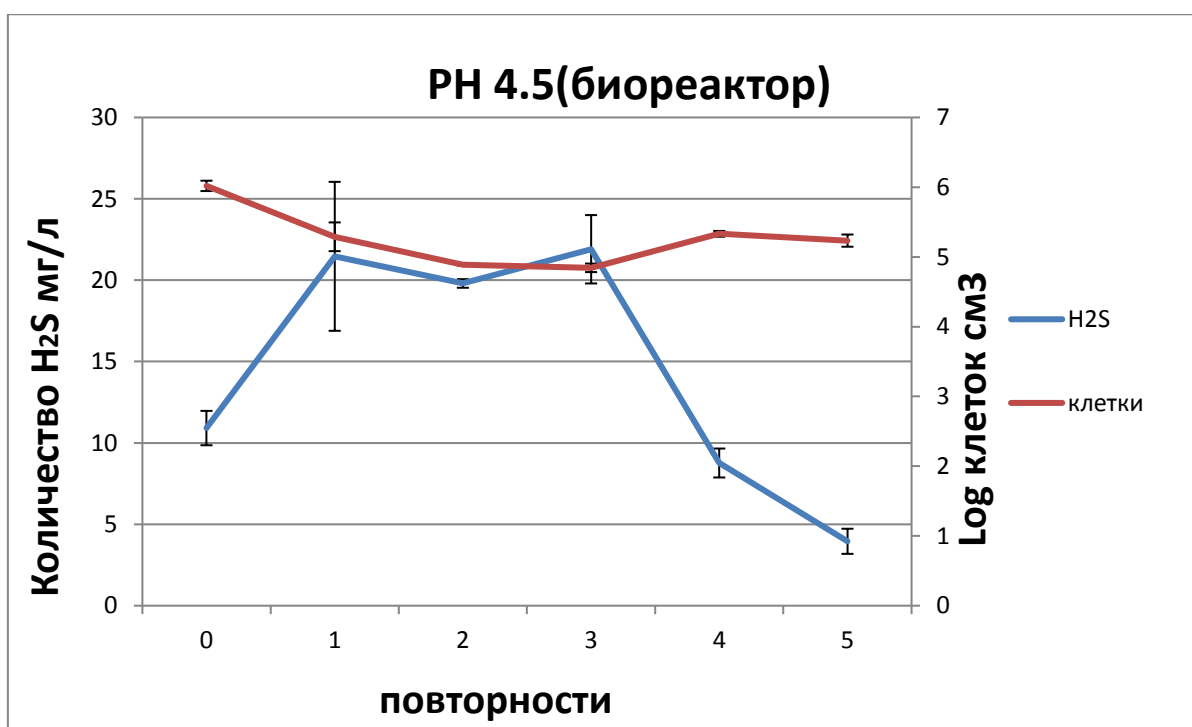
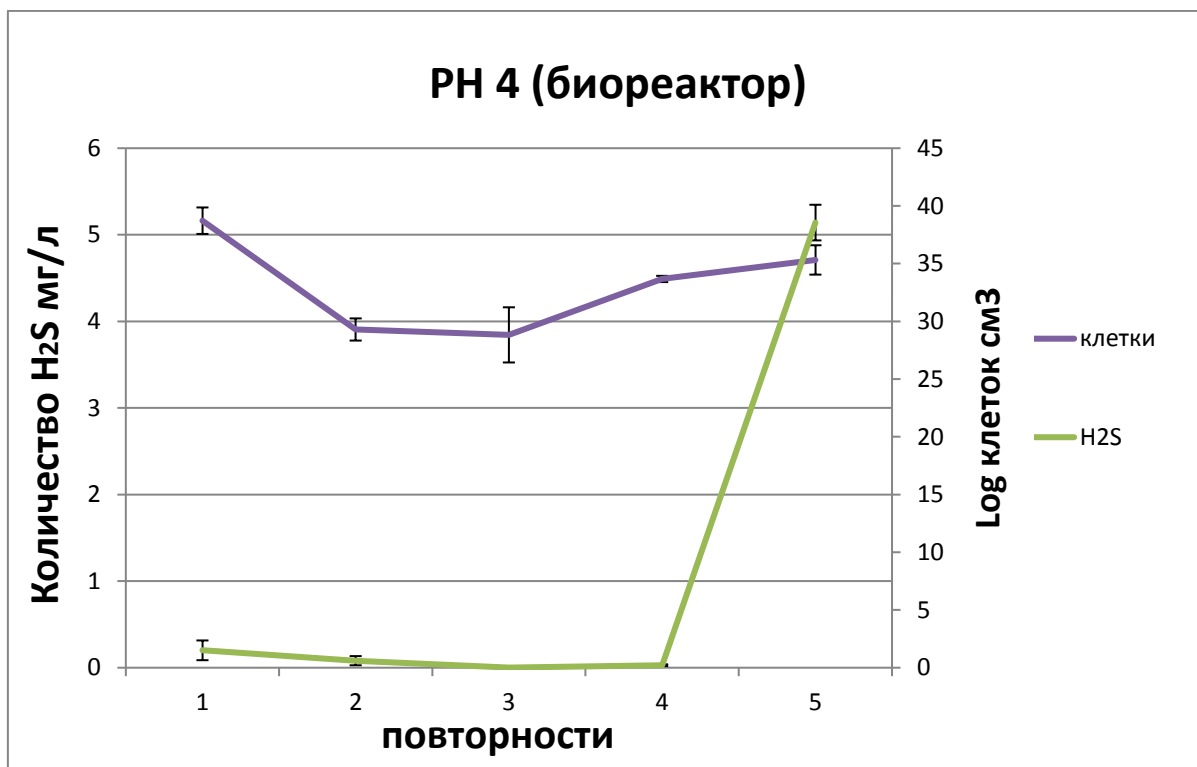
- 1 – 8 суток,
- 2 – 18 суток,
- 3 – 24 суток,
- 4 – 32 суток.

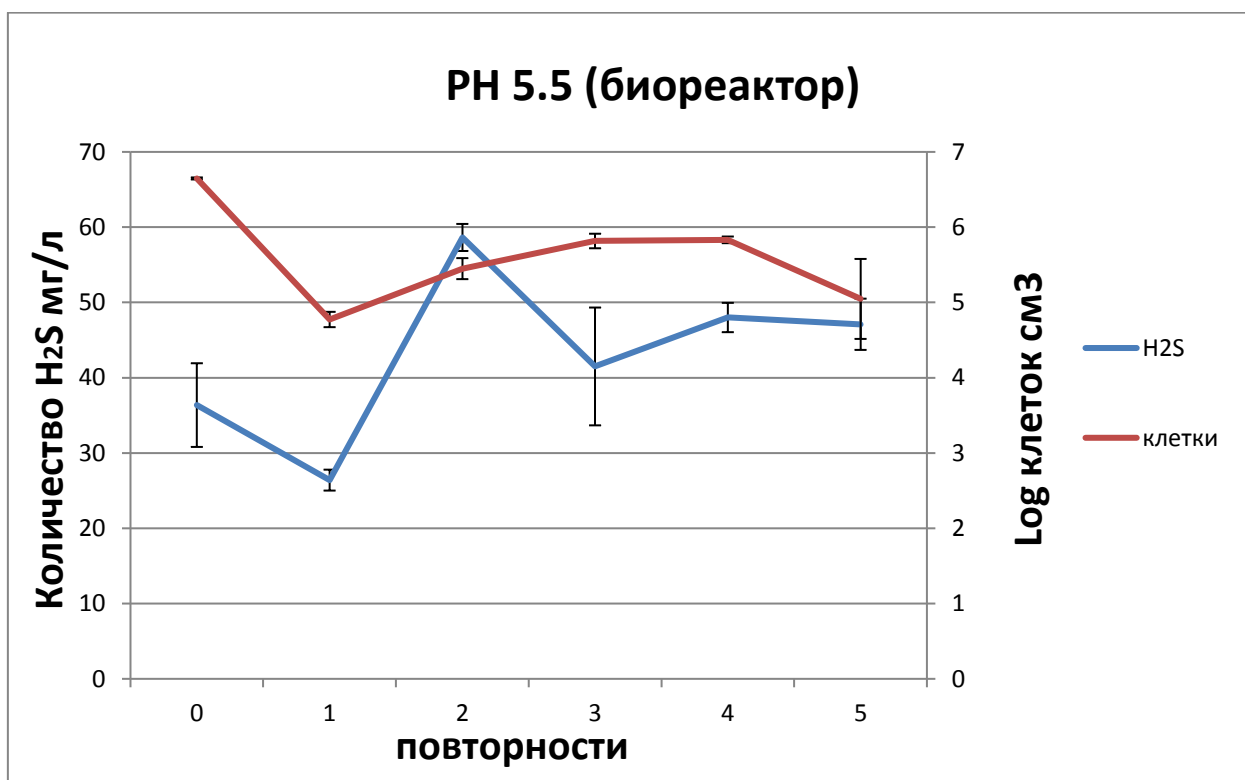
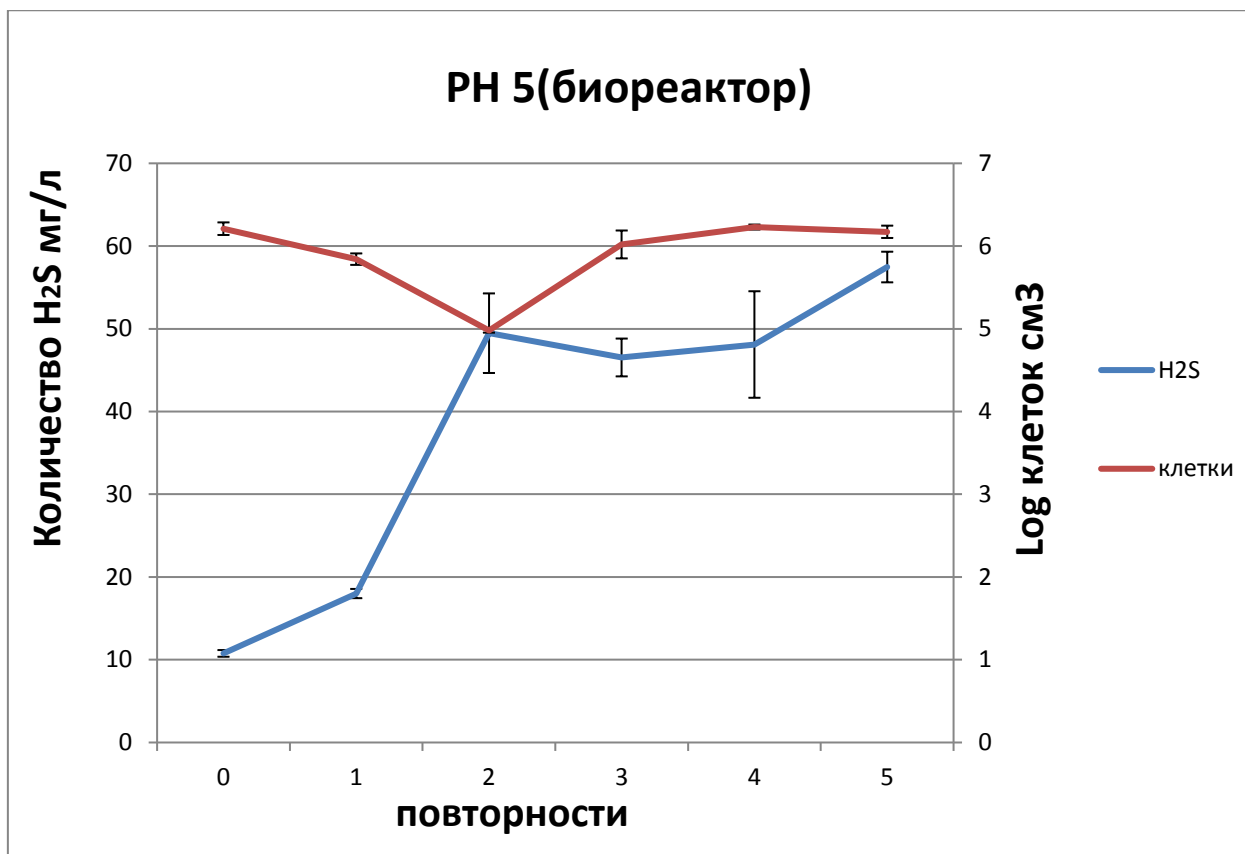
Обозначения на дифрактограмме:

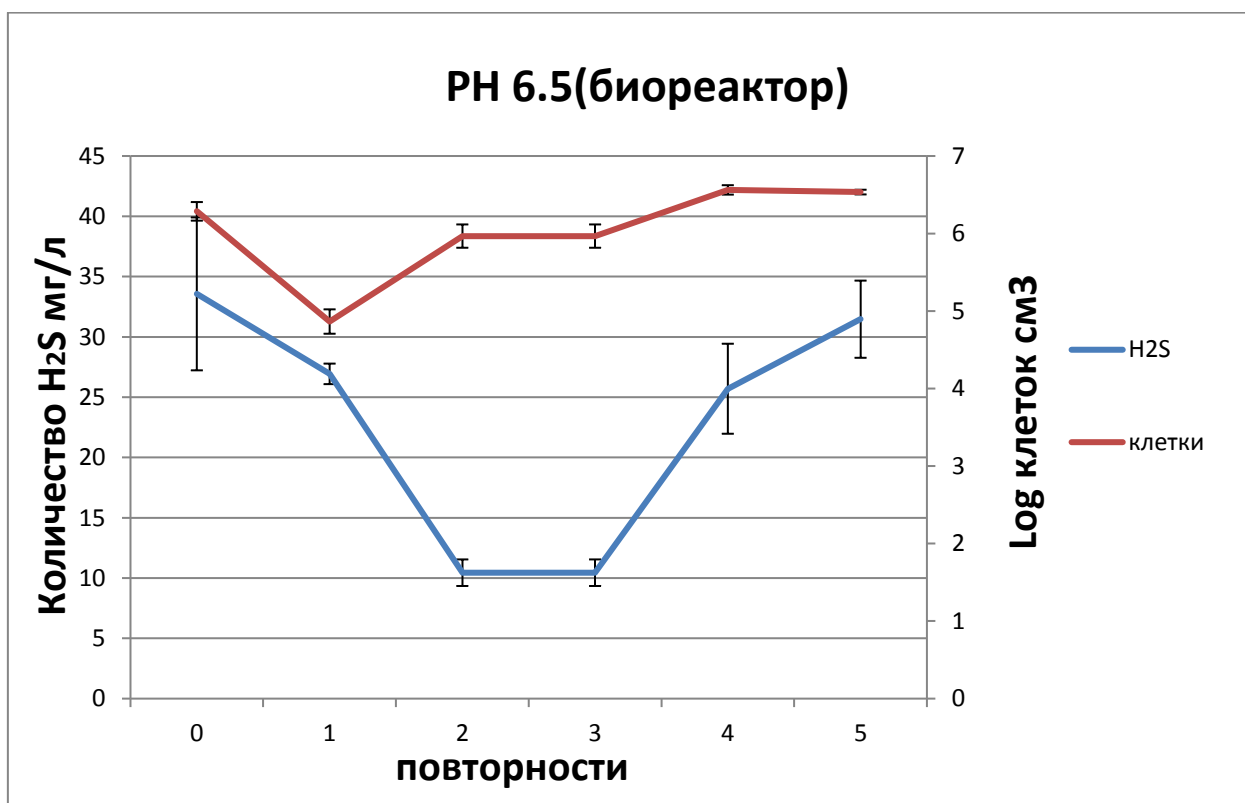
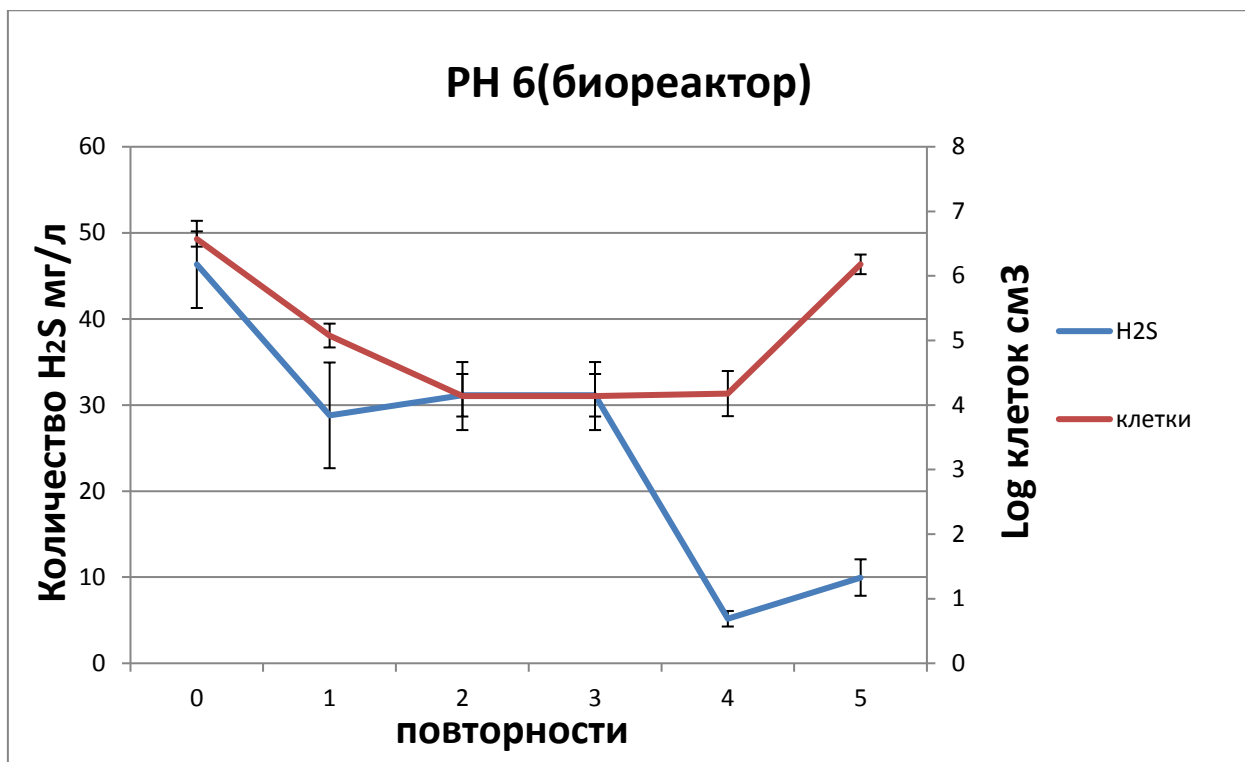
S	Кристаллическая сера	Sulfur (brimstone)	S	08-0248
Gr	Грейгит	Greigite	Fe ₃ S ₄	16-0713

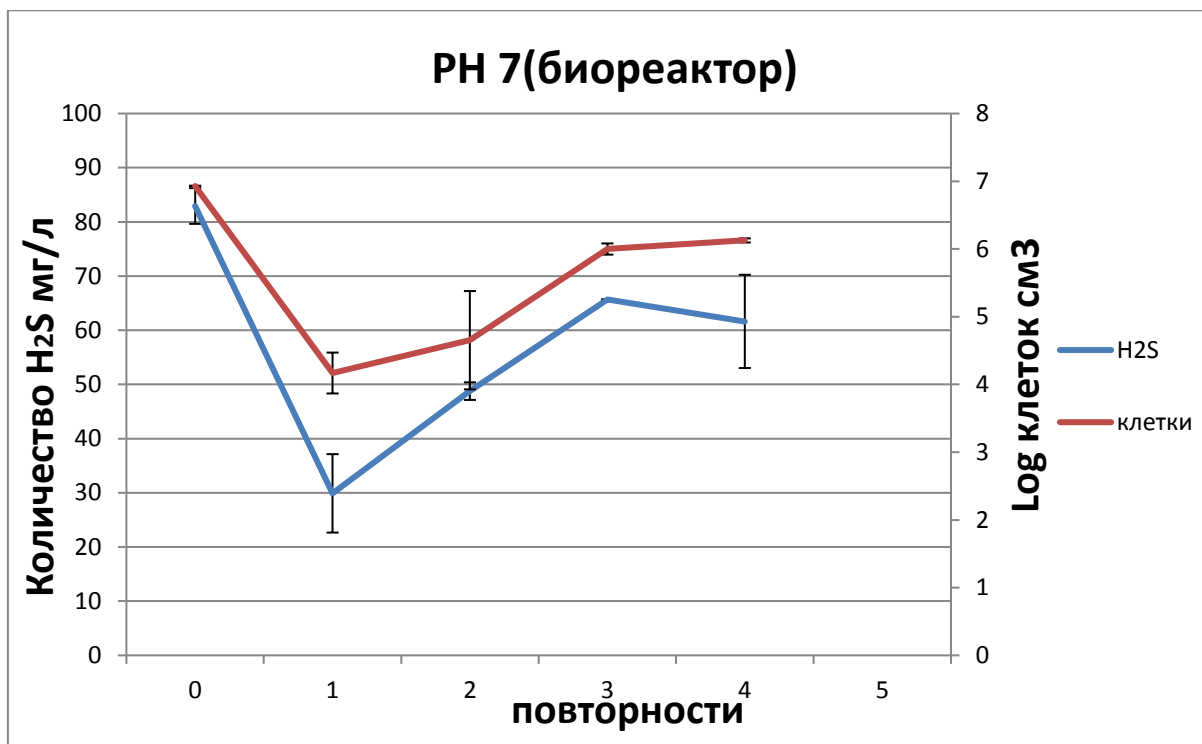
Приложение 2

Графики, построенные на основании полученных данных численности культуры и анализа количества продуцируемого сероводорода.









Среднее количество клеток в (Log клеток см³) за период одного значения pH при культивировании в биореакторе

4,445475 – pH 4

5,267373 – pH 4.5

5,408751 – pH 5

5,59419 – pH 5.5

5,64674 – pH 6

6,030345 – pH 6.5

5,875473 – pH 7

Среднее значение количества H_2S в миллиграмм на литр при культивировании в биореакторе

12,2594444 – pH 4

14,4672222 – pH 4.5

28,3888889 – pH 5

33 – pH 5.5

35,4216667 – pH 6

43,0922222 – pH 6.5

57,78 – pH 7

Отчет о проверке на заимствования №1



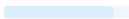
Автор: Иванов Михаил misham723@gmail.com / ID: 5394931
Проверяющий: Иванов Михаил (misham723@gmail.com / ID: 5394931)
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- <http://users.antiplagiat.ru>

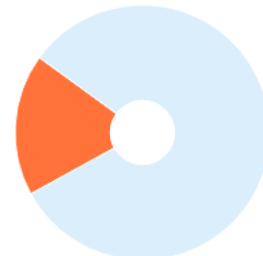
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 13
Начало загрузки: 02.06.2019 10:37:23
Длительность загрузки: 00:00:02
Имя исходного файла: ДИПЛОМкоррект
Размер текста: 2086 кБ
Символов в тексте: 63366
Слов в тексте: 7456
Число предложений: 524

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 02.06.2019 10:37:26
Длительность проверки: 00:00:02
Комментарии: не указано
Модули поиска: Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
18,4% 	0% 	81,6% 



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	0,08%	5,53%	Скачать - 0 байт	http://nauchkor.ru	17 Апр 2017	Модуль поиска Интернет	1	8
[02]	2,9%	4,57%	Metod_MU_LR_Metody_analiz...	https://swsu.ru	23 Апр 2017	Модуль поиска Интернет	3	10
[03]	2,28%	3,57%	Сборник научных трудов, То...	http://portal.tpu.ru:7777	18 Дек 2017	Модуль поиска Интернет	1	4

Еще источников: 17
Еще заимствований: 13,13%