

УДК 579.8: 631.461.5

## ДІАЗОТРОФИ РОДУ AZOSPIRILLUM ЯК ЕНДОФІТИ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ЯРОЇ

Копилов Є.П., Мамчур О.Є., Стрекалов В.М.

*Діазотрофи роду Azospirillum як ендofіти рослин пшениці ярої – Копилов Є.П., Мамчур О.Є., Стрекалов В.М.- За допомогою резистентного методу і електронно-мікроскопічних досліджень показано, що азотфіксувальні бактерії роду Azospirillum здатні активно колонізувати ризосферу, поверхню коренів, а також проникати у внутрішні тканини рослин пшениці ярої. Виділений із ризосферного ґрунту пшениці ярої штамп A. brasilense 102 утворює ефективну ендofітну асоціацію з рослинами зазначеної культури, яка характеризується високою нітрогеназною активністю. Клітини азоспірил, при інтродукції A. brasilense 102 в кореневу зону рослин, виявляли в муцигелі на поверхні корневих волосків, всередині клітин паренхіми кореня пшениці і в міжклітинному просторі тканини кореня.*

**Ключові слова:** пшениця яра, діазотрофи, ендofіти, азотфіксувальні бактерії, Azospirillum brasilense.

**Адреса:** Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна, e-mail: evhenyukopilov@rambler.ru

*Nitrogen-Fixing Bacteria Of Azospirillum Genus As Spring Wheat Plants Endophytes – Kopylov E.P., Mamchur O.E., Strekalov V.M.-With the help of resistance method and the electronic microscopy investigations it was established that nitrogen-fixing bacteria of Azospirillum genus are able to colonize actively rhizosphere, root surface and penetrate into the inner tissues of spring wheat plants. The strain of A. brasilense 102, isolated from rhizosphere soil of spring wheat, makes up an effective endophyte association with mentioned culture which characterized by high nitrogenase activity. During the introduction of A. brasilense 102 into root zone the bacteria cells were revealed in mucigel on the root hair surface, inside of root parenchyma cells and intercellular space of root tissues.*

**Key words:** spring wheat, diazotrophs, endophytes, nitrogen-fixing bacteria, Azospirillum brasilense

**Adress:** The Institute of Agriculture Microbiology UAAS, Shevchenko str. 97, Chernigov, 14027, Ukraine, e-mail: evhenyukopilov@rambler.ru

### Вступ

Біологічна фіксація молекулярного азоту, яка здійснюється ґрунтовими мікроорганізмами, протягом багатьох років є однією з найважливіших проблем біології. Здатність відновлювати  $N_2$  до  $NH_4^+$  виявлена у представників усіх основних груп прокариот (еубактерій, ціанобактерій, актиноміцетів, архебактерій), на відміну від еукаріотичних організмів (грибів, рослин, тварин), які неспроможні засвоювати азот атмосфери.

Вищі рослини в ході еволюції пристосувалися до співіснування з бактеріями-діазотрофами, щоб отримувати відновлені сполуки азоту. Таке співіснування рослин з мікроорганізмами варіюється від слабких асоціацій (колонізація діазотрофами ризосфери рослин) до тісних симбіотичних відносин, коли мікроорганізм проникає всередину тканин рослини (симбіоз бобових і бульбочкових бактерій). Втім і асоціації і симбіози діазотрофів з рослинами для обох партнерів є факультативними: мікроорганізми

можуть існувати в ґрунті поза рослиною як сапрофіти, рослини також можуть нормально розвиватися, використовуючи мінеральні і органічні сполуки азоту. Але вступаючи в тісні взаємодії з мікроорганізмами-азотфіксаторами рослини розширюють свої екологічні можливості і набувають нових метаболічних функцій [10].

Чисельні літературні дані свідчать, що бактеріальна ендofітія досить поширене природне явище. Описано багато видів мікроорганізмів, які проникають у рослинні тканини, не викликаючи в них патологічних змін [12].

Ендofіти-діазотрофи викликають інтерес у зв'язку з їхньою екологічною роллю та можливим практичним використанням. Локалізація діазотрофів у тканинах кореня рослин сприятлива для процесу азотфіксації, оскільки в мікронах їхнього розташування забезпечується низький парціальний тиск кисню, що необхідно для активного функціонування бактеріальної нітрогенази, і доступний енергетичний матеріал для цього процесу. Крім того, відбувається тісна

взаємодія мікро- і макропартнера, що робить можливим обмін сигнальними молекулами та метаболітами. Так, від діазотрофів у рослину безпосередньо надходять фіксований азот і фітогормони [11, 16].

Серед ендofітів-діазотрофів найбільшою нітрогеназною активністю і здатністю позитивно впливати на ріст і розвиток рослин відрізняються азоспірили. Показано, що бактерії роду *Azospirillum* також продукують біологічно активні речовини, під впливом яких активізується хлоропластогенез [3], поліпшується ріст і розвиток рослин [1, 8], підвищується стійкість рослин до несприятливих чинників навколишнього середовища [2], збудників хвороб рослин [9]. Методи світлової й електронної мікроскопії з використанням флуоресцентних антитіл, а також застосування олігонуклеотидних зондів та скануючої лазерної мікроскопії дозволили показати, що азоспірили здатні не тільки проникати в муцигель на поверхні коренів деяких тропічних рослин, а також колонізувати кореневі волоски [13], міжклітинний простір ксилеми, кори і стели [15, 18, 21]. Азоспірили виявлялись також всередині клітин кори і судин ксилеми [14, 17, 20,].

Пошук нових штамів діазотрофів-ендофітів та створення на їхній основі біопрепаратів для ефективного використання біологічного азоту відкриває широку перспективу підвищенню урожайності сільськогосподарських культур.

З ризосферного ґрунту пшениці ярої сорту Рання нами були виділено чисту культуру бактерій роду *Azospirillum*, яка характеризувалася високою нітрогеназною активністю. Ідентифікація бактерії за фенотипними ознаками і з використанням сіквенс-аналізу генів 16S рРНК дозволила віднести виділений штам до роду *Azospirillum*, виду *A. brasilense*. [6].

Метою нашої роботи було дослідити здатність *Azospirillum brasilense* 102 колонізувати кореневу систему пшениці ярої, проникати всередину клітин та вступати в ендofітні асоціації з рослинами культури.

### Матеріал і методика досліджень

Вивчення здатності азоспірил колонізувати різні сфери кореневої системи пшениці ярої здійснювали за допомогою резистентного методу з попереднім одержанням генетично маркованого штаму по ознаці стійкості до високих доз стрептоміцину [7]. З цією метою було одержано мутант штаму *A. brasilense* 102 (стійкий до стрептоміцину в дозі 1000 мкг/мл).

Вивчення здатності стрептоміцинстійкого мутанту азоспірил приживатися в різних сферах кореневої системи пшениці ярої сорту Рання 93 здійснювали за умов вегетаційного дослідження. Вегетаційний дослід проводили у вегетаційному будиночку на дерново-середньопідзолистому

пилуватосупіщаному ґрунті, який характеризувався наступними агрохімічними показниками: вміст гумусу становив 1,02%; азоту (за Корнфільдом) - 54,9 мг/кг; рухомих форм фосфору (за Кірсановим) - 280-300 мг P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, обмінного калію (за Кірсановим) - 140-148 мг K<sub>2</sub>O на 1 кг ґрунту; рН<sub>сол.</sub> - 5,2; Ca - 5,8, Mg - 0,61 мг-екв на 100 г ґрунту. Вологість ґрунту підтримували на рівні 60% від повної вологоємності. В досліді використовували гончарні вазони розміром 12×15 см, місткість вазонів становила 2,0 кг. Насіння пшениці ярої сорту Рання 93 висівали на глибину 2,0 см, кількість рослин в кожній посудині складала 20 штук. Повторність дослідів 10-разова.

Інокуляцію насіння пшениці ярої здійснювали трьохдобовою культурою *A. brasilense* 102<sup>str</sup>, яку вирощували на картопляному агарі з малатом із розрахунку 200 тис. бактеріальних клітин на одну насінину. Тривалість вегетаційного дослідження - 42 доби після посіву. З періодичністю в 7 діб робили посіви відібраних зразків ризосферного ґрунту, відмитих коренів і гістосфери рослин на поживні середовища: напіврідке Доберейнер і агаризоване Касереса з метою визначення чисельності інтродукованого штаму.

Для електронно-мікроскопічних досліджень використовували корені 24-добових рослин пшениці ярої, яку вирощували в лабораторному досліді за стерильних умов. Для цього насіння культури стерилізували 0,1% розчином AgNO<sub>3</sub> протягом 3-х хвилин і поміщали в колби Ерленмейера місткістю 500 мл, в яких містився річковий пісок в кількості 200 г. Пісок спочатку промивали водою, висушували за температури 50-60° С. Висушений пісок промивали концентрованою соляною кислотою, потім водою і знову висушували. Промитий сухий пісок поміщали в колби Ерленмейера, зволожували поживним розчином Кнопа (60% від повної вологоємності піску) і стерилізували за режиму - 1 атм, 20 хв. Як джерело азоту використовували янтарно кислий натрій.

Фіксацію коренів проводили 5% розчином глютаральдегіда, який виготовляли на фосфатному буфері (рН 7,4) і OsO<sub>4</sub>. Зневоднення - 50, 70, 76 і 100% спиртами. Заливку здійснювали сумішшю смол Епон-812, DDSA, MNA, ДМР-30. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікромомі B5 490 А "Tesla" і переглядали на електронному мікроскопі B5 540 А "Tesla".

Нітрогеназну активність чистих культур діазотрофів *A. brasilense* 102 і *A. brasilense* 102<sup>str</sup>, що вирощувались на безазотному напіврідкому середовищі Доберейнер, визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі "Chrom-4" з полум'яноіонізаційним детектором. Колонка довжиною 370 см заповнена хромосорбом з β-β-оксидіпропіонітрилом, Температура термостату 50° С, газ-носії - азот, витрата газів ( в

мл/хвилину): водню - 30, азоту - 100, повітря - 500.

Нітрогеназну активність азоспірил в асоціації з рослинами пшениці ярої, що вирощувалась у вегетаційному досліді на дерново-середньопідзолистому пилуватосупіщаному ґрунті і на річковому піску за стерильних умов, визначали ацетиленовим методом. З цією метою корені рослин багаторазово відмивали водопровідною і п'ятикратно стерильною водою при співвідношенні коренів і води 1:20 та поміщали у флакони, місткістю 40 см<sup>3</sup>. Флакони герметизували, вводили ацетилен (10% від об'єму газової фази у флаконі) та інкубували протягом 1

години за температури 28° С. Після закінчення строку інкубації зразки аналізували на газовому хроматографі.

### Результати досліджень та їх обговорення

Отриманий стрептоміцинстійкий мутант *A. brasilense* 102<sup>str</sup> не відрізнявся від вихідного штаму за морфолого-культуральними і фізіологічними ознаками. Нітрогеназну активність вихідного штаму і одержаного мутанта в чистій культурі і в асоціації з рослинами наведено в табл. 1.

Таблиця 1 Нітрогеназна активність азоспірил в чистій культурі і в асоціації з рослинами пшениці ярої (вегетаційний дослід)

Table 1. Nitrogenase activity in *Azospirillum* clean culture and in association with spring wheat plants (vegetative experiment)

Варіант досліді	Азотфіксувальна активність, нмоль C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /1 мл живильного середовища за добу	Активність азотфіксування, нмоль C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /рослину за годину
<i>A. brasilense</i> 102	1350±53,7	48,6±3,3
<i>A. brasilense</i> 102 <sup>str</sup>	1400±62,4	46,4±3,7

Динаміку чисельності мутанта, інтродукованого у кореневу зону пшениці ярої, вивчали у ризосферному ґрунті, на відмитих коренях і в гітосфері рослин за умов вегетаційного досліді (табл.2).

Як свідчать одержані результати, інтродуковані азоспірили здатні приживатися у ризосферному ґрунті, на поверхні коренів, а також проникати у внутрішні тканини рослин пшениці ярої. У ризосферному ґрунті спостерігалось незначне зниження і подальша стабілізація чисельності внесеного мутанта на рівні 1,6-4,0Ч10<sup>5</sup> бактеріальних клітин в 1 г ґрунту. Більш активно азоспірили приживалися на поверхні коренів рослин, досягаючи чисельності на порядок вище, ніж у ризосфері. Чисельність мутанта у внутрішніх тканинах культури була значно меншою і складала 1,0-2,5Ч10<sup>2</sup> бактеріальних клітин в 1 г коренів, але така локалізація дає їм певні переваги у порівнянні з ризосферними мікроорганізмами відносно доступу до поживних речовин і відсутності конкуренції з аборигенною мікрофлорою.

Електронно-мікроскопічні дослідження ультратонких зрізів коренів рослин пшениці ярої, що вирощувалась за стерильних умов, дозволили простежити за процесом колонізації інтродукованим штамом *A. brasilense* 102 кореневої системи культури. Так, встановлено, що клітини азоспірил покривають поверхню

кореневих волосків (рис. 1), проникають всередину клітин паренхіми кореня (рис. 2) та в міжклітинний простір кореневої тканини (рис. 3).

Клітини азоспірил, що заселяють рослинні тканини, характеризуються певними структурними особливостями у порівнянні з азоспірилами, культивованими на поживних середовищах. В рослинних клітинах та міжклітинному просторі вони оточені осміофільною оболонкою, під якою розташовано осміофобний простір. Така цистоподібна форма характерна для симбіосом, які є типовими структурами бобово-ризобіального симбіозу.

Цистоподібні форми азоспірил, які нагадували симбіосоми були виявлені в міжклітинниках і в живих рослинних клітинах коренів картоплі, яку культивували *in vitro* і інокулювали різними штамми азоспірил: *A. lipoferum* 4014, *A. lipoferum* ЛС-3 та *A. brasilense* 410 [5]. Втім, незважаючи на те, що асоціаціям азоспірил з рослинами притаманна висока активність азотфіксування, на коренях картоплі, яку культивували *in vitro* і інокулювали різними штамми азоспірил, нітрогеназну активність не виявили. Дослідники пояснюють цей факт тим, що в середовищі Мурасіго-Скуге, яке використовували для культивування картоплі, містився надлишок азоту, який, можливо, і був інгібітором нітрогеназного ферментного комплексу азоспірил [5].

Таблиця 2. Колонізація *A. brasilense* 102<sup>str</sup> різних кореневих сфер пшениці ярої (вегетаційний дослід)

Table 2. Colonization of different spring wheat spheres with *A. brasilense* 102<sup>str</sup> (vegetative experiment)

Варіант дослід		Кількість бактеріальних клітин, один./г сухих коренів (грунту)					
		Доба після інтродукції					
		7	14	21	28	35	42
Ризосферний ґрунт	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 102 <sup>str</sup>	3,1 ± 0,28Ч10 <sup>6</sup>	1,0 ± 0,08Ч10 <sup>5</sup>	3,2 ± 0,36Ч10 <sup>5</sup>	1,6 ± 0,06Ч10 <sup>5</sup>	2,5 ± 0,26Ч10 <sup>5</sup>	4,0 ± 0,38Ч10 <sup>5</sup>
Відмиті корені	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 102 <sup>str</sup>	3,1 ± 0,40Ч10 <sup>7</sup>	6,3 ± 0,59Ч10 <sup>6</sup>	2,5 ± 0,31Ч10 <sup>6</sup>	1,0 ± 0,1Ч10 <sup>7</sup>	6,3 ± 0,58Ч10 <sup>6</sup>	1,6 ± 0,9Ч10 <sup>7</sup>
Гітосфера	Інокуляція <i>A. brasilense</i> 102 <sup>str</sup>	0,12 ± 0,01Ч10 <sup>2</sup>	0,32 ± 0,04Ч10 <sup>2</sup>	1,26 ± 0,08Ч10 <sup>2</sup>	2,51 ± 0,30Ч10 <sup>2</sup>	1,0 ± 0,08Ч10 <sup>2</sup>	2,0 ± 0,03Ч10 <sup>2</sup>

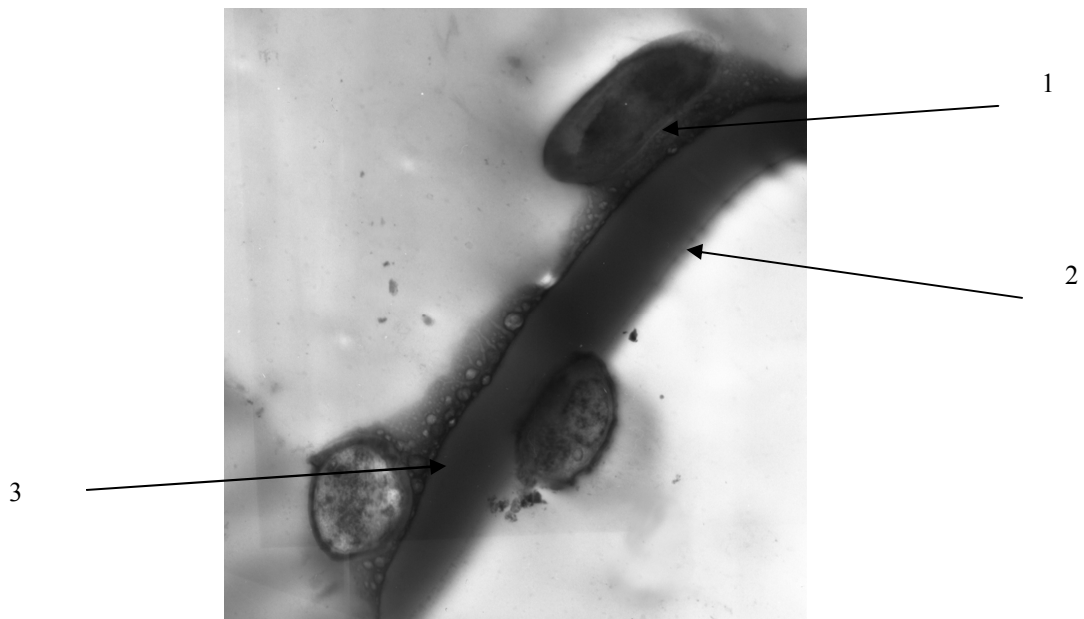


Рис. 1. Клітини азоспірил в муцигелі на поверхні кореневого волоску пшениці ярої (ультратонкий зріз, електронна мікроскопія, Ч4000)

Fig. 1. Azospirillum cells in mucigel on the spring wheat root hair surface (ultra thin cut in, electronic microscopy, Ч4000)

1 - клітини азоспірил (*A. brasilense* 102), 2 - кореневий волосок пшениці ярої, 3 – муцигел

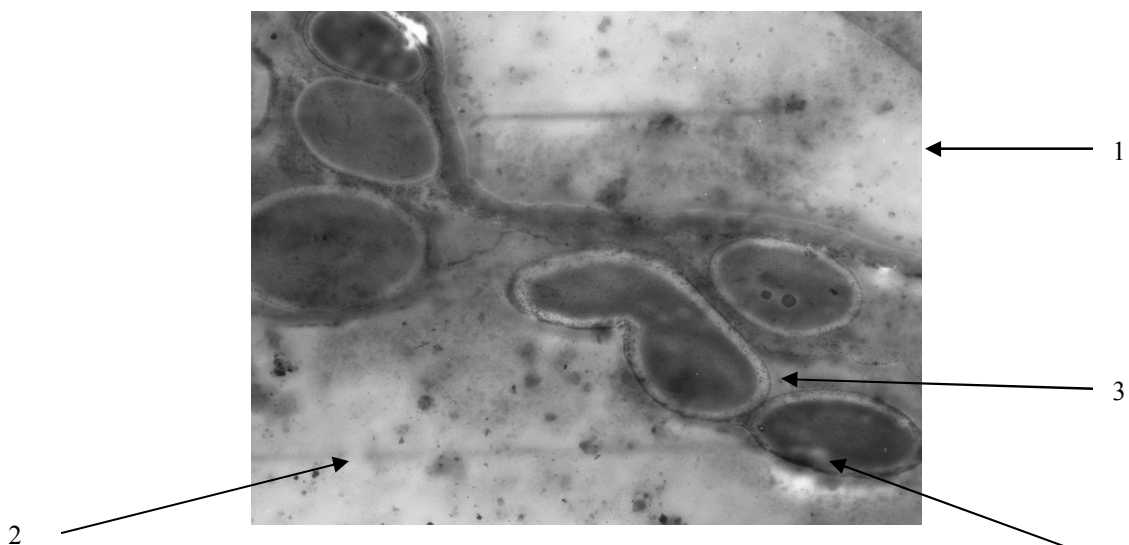


Рис. 2. *A. brasilense* 102 всередині рослинної клітини тканини кореня пшениці ярої (ультратонкий зріз, електронна мікроскопія, Ч15000)

Fig. 2. *A. brasilense* 102 inside of plant cell in spring wheat root tissue (ultra thin cut in, electronic microscopy, Ч15000)

1 - міжклітинний простір, 2 - цитоплазма клітини, 3 - осміофільна оболонка *A. brasilense* 102, 4 - осміофобний простір *A. brasilense* 102

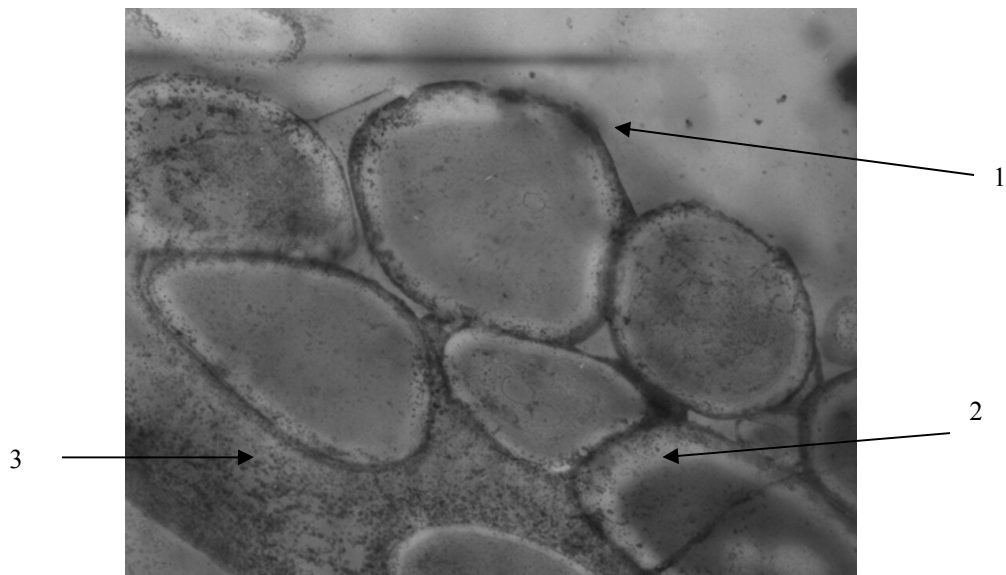


Рис. 3. *A. brasilense* 102 в міжклітинному просторі тканини кореня пшениці ярої (ультратонкий зріз, електронна мікроскопія, Ч15000)

Fig. 3. *A. brasilense* 102 in the intercellular space of spring wheat root tissues (ultra thin cut in, electronic microscopy, Ч15000)

1 - осміофільна оболонка *A. brasilense* 102, 2 - осміофобний простір *A. brasilense* 102, 3 - осміофільні гранули міжклітинного простору

В наших досліджах нітрогеназна активність на відмитих коренях пшениці ярої, інюкульованої *A. brasilense* 102 і вирощеної за стерильних умов, була досить значною:  $26,3 \pm 2,4$  нмоль  $C_2H_2$  /рослину за годину. Це є свідченням того, що зазначений штам азоспірил, інтродукований в кореневу зону пшениці, здатний утворювати ефективну асоціативну систему з рослинами.

Отже, нами показано, що виділений із ризосферного ґрунту пшениці ярої штам *A. brasilense* 102 утворює ендосферну асоціацію з рослинами цієї культури, яка характеризується високою активністю фіксації атмосферного азоту.

Існує думка про те, що здатність азоспірил виступати ендосферами рослин є штамовою особливістю. Так, штам Sp.7 (типовий для виду *Azospirillum brasilense*) вважається ризосферним мікроорганізмом на відміну від штаму *Azospirillum brasilense* Sp.245, який інфікує корені пшениці [19, 20]. Зазначені штами є зручною моделлю для вивчення особливостей мікробно-рослинної взаємодії і використовуються в

багатьох лабораторіях світу. Крім суто наукового значення, пошук і використання нових штамів діазотрофних мікроорганізмів, здатних до ендосферити з рослинами, має незаперечну практичну цінність. Інтродукція діазотрофів-ендосферитів у кореневу зону рослин дозволяє забезпечити сільськогосподарські культури атмосферним азотом і при цьому уникнути втрат азоту через процеси денітрифікації. Адже весь азот, що фіксується діазотрофами-ендосферами, повністю залучається до складу рослин [4].

Таким чином, за допомогою резистентного методу і електронно-мікроскопічних досліджень показано, що отриманий нами новий штам *A. brasilense* 102 при інтродукції в кореневу зону пшениці ярої здатний активно колонізувати ризосферу, поверхню коренів, а також проникати у внутрішні тканини рослин, утворюючи ефективну ендосферну асоціацію з рослинами культури, яка характеризується високою нітрогеназною активністю.

1. Антонюк Л.П., Игнатов В.В. Почвенные ассоциативные симбиозы бактерий и злаков: от фундаментальных исследований к практическому использованию / Фундаментальные и прикладные исследования саратовских ученых для процветания России и Саратовской губернии. Из-во Сарат. ун-та, 1999. - С. 153-155.
2. Белимов А.А., Кунакова А.М., Груздева Е.В. Влияние рН почвы на взаимодействие ассоциативных бактерий с ячменем // Микробиология. - 1998. - Т.67, №4. - С.561-568.
3. Белорукова О.К. Оценка характера взаимодействия озимой пшеницы с ассоциативными азотфиксирующими бактериями // Вестник Харьковского гос. аграрн. ун-та. Серия "Растениеводство". - 1998. - С. 32-38.
4. Біологічний азот / В.П. Патики, С.Я. Коць, В.В. Волкогон та ін. / За ред. В.П. Патики. - К.: Світ, 2003. - 424с.
5. Волкогон В.В., Димова С.Б., Мамчур А.Е. Особенности взаимоотношений бактерий рода *Azospirillum* с растениями картофеля, культивируемыми *in vitro* // С.-г. мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. - Чернігів: ЦНТЕІ, 2005. - Вип.3. - С.19-25.
6. Копылов Е.П. Определение видовой принадлежности бактерий рода *Azospirillum* с использованием методов молекулярно-генетического анализа // Микроорганизмы и биосфера: Междунар. научн. конф. (Москва, 19-20 ноября 2007г.): Тезисы. - Москва: "Макспресс". - 2007. - С.66-67.

7. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. проф. Д.Г. Звягинцева. Изд-во Московского ун-та. - 1980. - 224с.
8. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика / за ред. В.В.Волгонона. - Київ:Аграрна наука, 2006. - 311с.
9. Надкерничний С.П., Надкернична О.В. Бактерії *Azospirillum brasilense* як фактор підвищення імунітету рослин до збудників корневих гнилей // Бюл. Інституту с.-г. мікробіології. - 1999. -№4. - С.14-17.
10. Проваров Н.А. Происхождение и эволюция бобово-ризобияльного симбиоза //Изв. Академии наук СССР. Сер. биол. - 1991. - №1. - С.77-87.
11. Чернышова М.П., Игнатов В.В. Внеклеточные протеолитические и пектинолитические ферменты бактерий рода *Azospirillum* в процессе ассоциативного взаимодействия с растениями // Сборник докладов XII Юбилейной конференции "Ферменты микроорганизмов", Казань, 2001, С. 48-49.
12. Шерстобоева О.В. Проблеми бактеріальної ендосфитії у рослинно-мікробній взаємодії // Агроекологічний журн. - 2006. №1. - С.15-19.
13. Assmus B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J.R., Hartmann A. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy // Appl. Environ. Microbiol., 1995, V. 61, N. 3, P. 1013-1019.
14. Cocking E.C. Xylem colonization of tomato by *Azorhizobium caulinodans* ORS571 // Acta biol. hung. - 2001. V.52, №2-3. - P.189-194.
15. De-Polli H, Bohlool B.B., Dobereiner J. Serological differential of *Azospirillum spesies* belonging to different host-specificity groups // Arch. Microbiol. - 1980. - V.126, №3. P.217-222.
16. James E.K., Olivares F.L., Baldan J.I., Dobereiner J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus* // J. Experiment. Bot. - 1994. -Vol. 45. - P.757.
17. Levanony H., Bashan Y. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd and within wheat root by immuno-gold labeling // Plant Soil. - 1989. V.117, №2. - P.207-218.
18. O'Hara R.W., Davey M.R., Lucas F.D. Association between the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum brasilense* and excised plant roots // Z. Pflanzen -physiol. - 1983. - V.113, №1. P.1-13.
19. Schloter M., Hartmann A. Production and characterization of strain-specific monoclonal antibodies against outer membrane components of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Hybridoma, 1996, V. 15, P. 225-232.
20. Schloter M., Hartmann A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain specific monoclonal antibodies // Symbiosis, 1998, V. 25, P. 159-179.
21. Webster G., Jain V., Davey M.R., Gough C., Vasse J., Denaire J., Cocking E.C. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans* // Plant Cell Environ. 1998. - V.21, №4. - P. 373-383

Отримано: 24 грудня 2008 р.

Прийнято до друку: 29 травня 2009 р.