

УДК 606:582.232

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ УВЕЛИЧЕНИЯ БИОМАССЫ И ПРОДУКТОВ СИНТЕЗА У РОДОВ *SPIRULINA* И *ARTHROSPIRA* (СЯНООРНУТА) ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Д. И. Петрухина

Калужский государственный университет им. К. Э. Циолковского, Россия

Исследовали состав компонентов питательных сред для рекультивирования цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после их длительной криоконсервации. Оценивали биологические закономерности роста и биосинтетической активности цианобактерий (продукции биомассы, липидов, белка и сахаров, фенольных соединений) в присутствии различных макро- и микроэлементов. Добавление ретентата молочной сыворотки к разбавленной питательной среде Заррука способствует повышению прироста биомассы цианобактерий *A. platensis* (от 8,4 до 25,5 %) и *S. subsalsa* (от 5,2 до 28,7 %) после криоконсервации по сравнению с выращиванием без добавления ретентата. В данных условиях выращивания увеличивалось содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий: в 1,4–1,8 раза у *S. subsalsa* и в 1,8–2,4 раза у *A. platensis*. Содержание липидов варьировало в биомассе *S. subsalsa* с 9,67 до 15,39 %, *A. platensis* – с 11,01 до 13,01 % при применении оригинального либо модифицированного ретентата молочной сыворотки. Применение модифицированного ретентата молочной сыворотки позволило увеличить содержание общего белка и редуцирующих сахаров в биомассе *S. subsalsa* на 14,67 и 4,69 %, а *A. platensis* – на 11,99 и 9,16 % соответственно по сравнению с оригинальным ретентатом молочной сыворотки. Сделан вывод о том, что разбавленная среда Заррука с добавлением 2,0 % модифицированного либо оригинального ретентата сыворотки может использоваться для выращивания цианобактерий после криоконсервации.

Ключевые слова: цианобактерии; прирост биомассы; биосинтетическая активность; макро- и микроэлементы.

D. I. Petrukhina. ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF AN INCREASE IN THE BIOMASS AND SYNTHESIS PRODUCTS OF *SPIRULINA* & *ARTHROSPIRA* (CYANOPHYTA) AFTER CRYOPRESERVATION

The composition of nutrient media for recultivation of cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Spirulina subsalsa* after their long-term cryopreservation was investigated. The effect of various macro- and microelements on cyanobacteria growth and biosynthetic activity (biomass production, phenolic compounds, lipids, protein and carbohydrate contents) was evaluated. The addition of whey retentate to diluted Zarrouk's medium promoted the increase in the biomass of *A. platensis* (8.4 vs. 25.5 %) & *S. subsalsa* (5.2 vs. 28.7 %) after cryopreservation compared to cultivation in diluted Zarrouk's medium without whey retentate. With these culture conditions, the content of phenolic compounds increased in both *S. subsalsa* (1.4–1.8-fold) and *A. platensis* (1.8–2.4-fold). The lipid content varied in *S. subsalsa* from 9.67 % to 15.39 % and in *A. platensis* from 11.01 to 13.01 % when

original or modified whey retentate were used. The application of modified whey retentate increased the content of total protein and carbohydrate by 14.67 and 4.69 % in *S. subsalsa* and by 11.99 and 9.16 % in *A. platensis*, respectively, compared to the results with original retentate. It was concluded that diluted Zarrouk's medium with the addition of 2.0 % of either modified or original whey retentate can be used for re-cultivation of cyanobacteria after cryopreservation.

Key words: cyanobacteria; biomass increment; biosynthetic activity; macro- and micronutrients.

Введение

Цианобактерии, в том числе *Spirulina* и *Arthrospira*, применяются в производстве пищевого белка, разнообразных лечебно-профилактических препаратов, высококачественных кормов для животных, пигментов и пищевых красителей, а также других востребованных продуктов для медицины, косметологии, животноводства и аквакультуры [Vonshak, 2002; Sili et al., 2012]. Представителей родов *Spirulina* и *Arthrospira* применяют для удаления нитратов, фосфора, аммония и мочевины из сточных вод [Converti et al., 2006; Mezzomo et al., 2010]. Эти цианобактерии исторически используются в питании человека, поскольку их биомасса содержит такие ценные соединения, как легкоусвояемые протеины, липиды, полисахариды, фенольные соединения, кроме того, имеет низкую калорийность и высокую биодоступность содержащихся в ней биологически активных компонентов [Koru, 2012]. В качестве корма для выращивания животных, в том числе рыб и беспозвоночных видов (например, гребешков), используется 30 % произведенной биомассы *Arthrospira* [Belay et al., 1996]. До недавнего времени интерес к *Spirulina* и *Arthrospira* ssp. основывался главным образом на пищевой ценности, однако они еще обладают высокой биологической активностью. Эта активность связана с содержанием в их составе компонентов, определяющих широкий спектр полезных свойств, таких как фикоцианин (синий пигмент), кальций-спирулан (сульфатированный полисахарид), циановирин-N и сульфолипиды. Хотя биомасса данных цианобактерий используется во всем мире прежде всего для извлечения компонентов с антиоксидантными свойствами, она также может применяться как сырье для биотоплива [Markou et al., 2013; Vieira Salla et al., 2016; Chen et al., 2018]. Представители родов *Spirulina* и *Arthrospira* благодаря возможности их относительно простого и безопасного культивирования выращиваются в промышленных масштабах во многих странах мира [Eriksen, 2008].

Одним из первых подробное исследование условий роста цианобактерии *Arthrospira* sp. провел Клод Заррук (Claude Zarrouk) в своей диссертационной работе. Питательная среда, разработанная Зарруком, стала стандартной средой для выращивания цианобактерий родов *Arthrospira* и *Spirulina* [Vonshak, 2002; Eriksen, 2008; Sili et al., 2012]. Представляется интересным возможное повторное использование питательной среды Заррука после выращивания на ней культур *Arthrospira* sp. и *Spirulina* sp., поскольку применение этой многокомпонентной среды для культивирования цианобактерий в больших объемах финансово затратно [Raouf et al., 2006; Madkour et al., 2012].

Эксперименты по выращиванию водорослей в «отработанных» питательных средах ведутся в последнее время недостаточно [Loftus, Johnson, 2017] и представлены лишь в нескольких работах Morocho-Jácome с соавт. [2016a, b]. Показано, что потребление цианобактериями основных питательных веществ из жидкой питательной среды Заррука обычно неполное, то есть после выращивания и отделения биомассы этих цианобактерий в культуральной среде присутствуют остаточные концентрации нитратов, фосфатов и карбонатов [Morocho-Jácome et al., 2016a, b]. Это позволяет провести лишь частичное их восполнение в питательной среде Заррука для ее повторного использования, например, для рекультивирования *Arthrospira* sp. и *Spirulina* sp. после длительной криоконсервации.

Ранее было показано, что миксотрофное культивирование в присутствии разных органических соединений, например, глюкозы, этанола и уксусной кислоты, приводит к повышению значения конечной концентрации биомассы цианобактерий [Golmakani et al., 2012]. Молочная сыворотка имеет высокое содержание органических соединений (в основном лактозы, а также L- и D-лактата, D-галактозы) и является основным и недорогим побочным продуктом, который образуется в процессе переработки молочного сырья [Vieira Salla et al., 2016], в связи с чем ее применение при культивировании

микроорганизмов экономически целесообразно. Кроме того, использование побочных продуктов, которые часто классифицируются как «отходы», для выращивания микроорганизмов может способствовать снижению затрат производства на их утилизацию.

Рост цианобактерий и состав их биомассы находятся в зависимости от многих факторов, наиболее важный из которых – это доступность питательных веществ, содержащихся в среде для культивирования [Olguín et al., 2001; Margarites, Costa, 2014]. Согласно литературным данным, выращивание цианобактерий на стандартной питательной среде Заррука, содержащей молочную сыворотку, способствует повышению прироста биомассы этих культур, а значит, и ценных продуктов, получаемых из их биомассы [Joshi et al., 2014; Vieira Salla et al., 2016]. Было выдвинуто предположение, что добавление молочной сыворотки к питательной среде для выращивания цианобактерий родов *Spirulina* и *Arthrospira* может повысить эффективность рекультивирования этих микроорганизмов после криоконсервации. Представлялось интересным также оценить влияние применения ретентата молочной сыворотки для обогащения разбавленной питательной среды Заррука на содержание белков, липидов, сахаров и фенольных соединений у рекультивированных после криоконсервации культур цианобактерий родов *Spirulina* и *Arthrospira*.

Материалы и методы

Опыты проводили с двумя видами цианобактерий *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 из коллекции культур университета Пастера, Франция. Исходные культуры *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 выращивали на жидкой питательной среде в автоклавированных конических стеклянных колбах Эрленмейера объемом 100 мл, с широким горлышком, с пробками из целлюлозной массы. Питательную среду Заррука стерилизовали фильтрованием через стерильный фильтр из ацетата целлюлозы (диаметр пор 0,45 мкм). Цианобактерии культивировали при температуре 30 °С в инкубаторе Minitron (фирма Infors HT, Швейцария) с постоянным перемешиванием с помощью встроенного орбитального шейкера диаметром качания 25 мм. Частота вращения составляла 110 об/мин. Освещение обеспечивали шестью люминесцентными лампами GroLux 15W (фирма Osram Sylvania, США), которые располагались над колбами на высоте 40 см, обеспечивая среднюю интенсивность света на поверхности клеточной суспензии

21 мкмоль/(м²с). Выращивание цианей осуществляли с 16-часовым фотоциклом.

После 12 дней культивирования питательную среду удаляли в стерильных условиях, а биомассу промывали стерильной дистиллированной водой. Отмытую биомассу в количестве 0,9 мл помещали в полипропиленовые криофлаконы объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой. Затем в эти же криофлаконы в качестве криопротектора добавляли одновременно стерильный раствор ДМСО в качестве криопротектора в двойной концентрации (20 %) до отметки общего объема в 1,8 мл. После этого криофлаконы выдерживали 10 мин в темноте при постоянном перемешивании на ротаторе со скоростью 20 об/мин.

После инкубирования с криопротекторами в темноте криофлаконы с биомассой помещали в полимерный контейнер для замораживания (Mr. Frosty, Nalgene, США), который был предварительно охлажден до 4 °С в течение минимум 5 часов. Данный контейнер обеспечивает воспроизводимую скорость охлаждения минус 1 °С в минуту. Контейнер Mr. Frosty с криофлаконами помещали в морозильную камеру, в которой поддерживалась постоянная температура минус 80 °С. Через 1,5 часа криофлаконы с цианеями перемещали из контейнера Mr. Frosty™ в пластиковые боксы и продолжали хранить 12 месяцев при температуре минус 80 °С.

Для размораживания криофлаконы с цианеями извлекали из морозильной камеры и переносили на водяную баню с температурой воды 37 °С, где выдерживали до исчезновения льда. После размораживания содержимое криофлакона переносили в стерильную колбу Эрленмейера с 10 мл питательной среды. Затем колбы Эрленмейера с цианеями инкубировали как исходные культуры.

Исходные культуры цианобактерий выращивали на питательной среде Заррука с pH от 9,1 до 9,6. Питательная среда Заррука использовалась в модификации от коллекции водорослей университета Гёттенгена, Германия (*Spirulina* Medium (=Spirul.)) (табл. 1.)

Представлялось интересным определить возможность использования разбавленной питательной среды Заррука (табл. 1.) для рекультивирования цианобактерий после криоконсервации. Разбавленная среда была получена путем добавления к стандартной питательной среде Заррука равного объема культуральной среды, оставшейся после выращивания на ней биомассы цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445, которую использовали для криоконсервации.

Для обогащения разбавленной среды Заррука использовали ретентат молочной сыворотки (рН 4,80, плотность 1,080 г/см³). После обогащения разбавленная (1:1) питательная среда Заррука содержала 2 % ретентата молочной сыворотки. Был применен оригинальный ретентат и модифицированный (табл. 2.).

Повторность в пределах одного варианта опыта с питательной средой – пятикратная. Каждый опыт повторяли три раза. На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. В статье обсуждаются величины, достоверные при $p < 0,05$.

В биомассе цианобактерий, культивируемых после криоконсервации, определяли содержание редуцирующих (восстанавливающих) сахаров (методом Миллера) [Miller, 1959], суммарного количества липидов (методом, основанным на реакции с сульфопосфорованилиновым реактивом) [Zöllner, Kirsch, 1962; Knight et al., 1972] и суммарного количества белка (методом Бредфорда) [Bradford, 1976]. Такие достаточно старые методические приемы были применены для эффективности проводимых исследований, верной интерпретации результатов и сравнения с данными других авторов, использующих такие же методы [Olguín et al., 2001; Raouf et al., 2006; Madkour et al., 2012; Markou et al., 2013; Margarites, Costa, 2014; Vieira Salla et al., 2016; Chen et al., 2018].

Определение общего содержания (суммы) фенольных соединений в экстракте цианобактерий проводили стандартным методом с применением реактива Фолина – Чокальтеу, как описано в работах Синглтона и соавт. [Singleton, Rossi, 1965; Singleton et al., 1999].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что использование разбавленной (1:1) среды Заррука не влияло на жизнеспособность и рост штаммов после криоконсервации цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 (табл. 3).

Так, у исследуемых штаммов *A. platensis* и *S. subsalsa* после оттаивания наблюдали рост клеток этих нитевидных цианобактерий (трихом) на разбавленной среде Заррука, а прирост биомассы составил 78,25 и 93,5 % соответственно по сравнению с этим показателем у цианобактерий, выращенных на стандартной питательной среде Заррука. Таким образом, полученные данные говорят о возможности применения для рекультивирования исследуемых цианобактерий после криоконсервации разбавленной среды Заррука. Разбавление

Таблица 1. Состав среды Заррука

Table 1. Composition of Zarrouk's medium

| Компонент Components | Содержание Content |
|--|-----------------------------|
| NaHCO ₃ | 13,61 г (g) |
| Na ₂ CO ₃ | 4,03 г (g) |
| K ₂ HPO ₄ | 0,50 г (g) |
| NaNO ₃ | 2,50 г (g) |
| K ₂ SO ₄ | 1,00 г (g) |
| NaCl | 1,00 г (g) |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,20 г (g) |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0,04 г (g) |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,01 г (g) |
| Na ₂ ЭДТА | 0,08 г (g) |
| раствор микроэлементов* micronutrient solution* | 5 мл (ml) |
| вода дистиллированная distilled water | до 1 литра up to 1 liter |

*Раствор микроэлементов для питательной среды Заррука

*Micronutrient solution for Zarrouk's medium

| Компонент Components | Первичный раствор [г/ 100 мл] Stock solution [g/ 100 ml] | Добавление в раствор микроэлементов Applied solution |
|---|---|---|
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,10 | 1 мл (ml) |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 0,10 | 2 мл (ml) |
| H ₃ BO ₃ | 0,20 | 5 мл (ml) |
| Co (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O | 0,02 | 5 мл (ml) |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,02 | 5 мл (ml) |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,0005 | 1 мл (ml) |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | - | 0,7 г (ml) |
| Na ₂ ЭДТА | - | 0,8 г (g) |
| вода дистиллированная distilled water | - | до 1 литра up to 1 liter |

Таблица 2. Состав оригинального и модифицированного ретентата молочной сыворотки

Table 2. Composition of whey retentate (original and modified)

| Компоненты Components | Ретентат молочной сыворотки, мг/л Retentate of whey, mg/L | |
|--------------------------|--|------------------------------|
| | Оригинальный Original | Модифицированный Modified |
| NH ₄ -N | 290 | 4610 |
| ortho-PO ₄ -P | 2150 | 2130 |
| K | 5320 | 6180 |
| Na | 5100 | 5800 |
| S | 147 | 4400 |
| Ca | 2330 | 2640 |
| Mg | 380 | 414 |
| Zn | 11,7 | 38 |
| Fe | <0,4 | 21,7 |
| Cu | <0,8 | 5,5 |
| Mn | <0,4 | 5,3 |

Таблица 3. Прирост биомассы у цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации

Table 3. Final biomass concentrations of *A. platensis* PCC 9223 and *S. subsalsa* PCC 9445 after cryostorage

| Питательная среда Заррука Zarrouk's medium | Прирост биомассы цианобактерий, г/л Final biomass concentrations, g/L | |
|--|---|---------------------------------|
| | <i>S. subsalsa</i> PCC 9445 | <i>A. platensis</i> PCC 9223 |
| Разбавленная Diluted medium | 0,633 ± 0,008 | 0,903 ± 0,001 |
| Стандартная Complete medium | 0,677 ± 0,002 | 1,154 ± 0,002 |

среды Заррука не только снижает стоимость питательной среды для выращивания *Spirulina* sp. и *Arthrospira* sp., но добавление культуральной среды после выращивания цианобактерий уменьшает также количество отходов, утилизируемых в окружающую среду.

Тем не менее, несмотря на эффективность применения разбавленной среды Заррука, в экспериментах наблюдается некоторое снижение прироста биомассы цианобактерий после криоконсервации. Поэтому представлялось целесообразным исследовать возможность оптимизации разбавленной среды Заррука путем внесения дополнительных соединений.

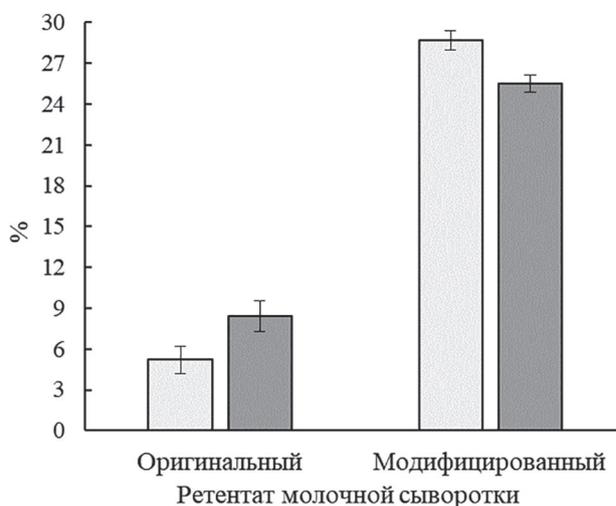
В дальнейших экспериментах по рекультивированию цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации использовали разбавленную питательную среду Заррука, то есть среду с дефицитом питательных веществ, обогащенную ретенатом молочной сыворотки (2 %).

Ретенат молочной сыворотки являлся продуктом ультрафильтрации кислой сыворотки с последующим обратным осмосом ультрафильтрационного пермеата. С целью определения возможности влияния молочной сыворотки в среде на эффективность рекультивирования криоконсервированные культуры *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 сразу после оттаивания выращивали на двух вариантах питательной среды, обогащенных оригинальным либо модифицированным ретенатом молочной сыворотки. Оригинальный ретенат помимо высокого содержания белка имел 290 мг/л общего аммонийного азота, 414 мг/л магния, а также высокое содержание кальция, калия и натрия. Модифицированный ретенат был дополнительно обогащен аммонийным азотом до 4610 мг/л и содержал больше биологически значимых элементов, таких как Zn, Fe, Cu, Mn, для компенсации их возможного дефицита в разбавленной питательной среде Заррука.

Результаты исследования показали, что добавление ретената молочной сыворотки к разбавленной питательной среде Заррука способствует повышению прироста биомассы цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 (от 8,4 до 25,5 %) и *S. subsalsa* PCC 9445 (от 5,2 до 28,7 %) после криоконсервации по сравнению с выращиванием без добавления ретената, т. е. с контрольной культурой (рис. 1).

Полученные результаты исследования позволяют считать, что повышение прироста биомассы цианобактерий после криоконсервации связано с питательными веществами, которые содержит ретенат молочной сыворотки. Причем наибольшие показатели были получены при применении модифицированного ретената молочной сыворотки по сравнению с культурами цианобактерий, выращенными после криоконсервации на разбавленной питательной среде Заррука без добавления ретената. Можно предположить, что полученные результаты связаны с составом используемого в нашей работе модифицированного ретената молочной сыворотки, который отличался повышенным содержанием азота и большим содержанием биологически значимых ионов металлов (Zn, Fe, Cu, Mn).

Такое предположение подтверждается исследованиями авторов о том, что питательные



□ *S. subsalsa* PCC 9445 ■ *A. platensis* PCC 9223

Рис. 1. Прирост биомассы цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации (% от контрольной культуры. В качестве контрольной выступала разбавленная питательная среда Заррука)

Fig. 1. Final biomass concentrations of *A. platensis* PCC 9223 and *S. subsalsa* PCC 9445 after cryostorage (% in comparison with control culture. The control – diluted Zarrouk's medium)

соединения молочной сыворотки усваиваются цианобактериями рода *Arthrospira*. Ранее выявлено, что цианобактерии растут на сточных водах завода по переработке молока (при разбавлении до 30 % с добавлением NaHCO_3 (16 г/л)) [Chang et al., 2013]. Также было показано, что при выращивании цианобактерий на подсырной сыворотке их биомасса увеличилась на 40–97 % [Cantú-Lozano et al., 2013].

В наиболее близкой к нашему исследованию работе [Vieira Salla et al., 2016] цианобактерию *A. platensis* выращивали на разбавленной дистиллированной водой среде Заррука (20- и 30%-й) с добавлением ретентата молочной сыворотки в концентрациях 1,25 и 2,5 %. Однако в статье показано, что замена стандартной среды Заррука на разбавленную (20- и 30%-ю) с добавлением ретентата молочной сыворотки не влияет на рост цианобактерии. Авторы отмечают, что достигли идентичной конечной концентрации клеток на стандартной среде Заррука и разбавленной с добавлением с 2,5 % ретентата молочной сыворотки. Такие данные можно объяснить тем, что в отличие от ретентатов (оригинального и модифицированного), используемых в данной работе, ретентат молочной сыворотки, используемый в работе Vieira Salla с соавт. [2016], имел высокое содержание лактозы (7,18 %), но меньшее содержание магния (118,20 мг/л) и общего аммонийного азота (107,10 мг/л).

Полученные нами данные показали, что обогащение питательной среды Заррука ретентатом молочной сыворотки способствует увеличению содержания суммарного количества белка, редуцирующих сахаров и общих липидов в биомассе *A. platensis* PCC 9223 (рис. 2, б) и *S. subsalsa* PCC 9445 (рис. 2, а), рекультивированных после криоконсервации. Это может быть связано с повышением эффективности фотосинтеза цианобактерий благодаря присутствию в питательной среде ретентата молочной сыворотки, который имеет высокое содержание магния.

Так, при добавлении оригинального ретентата молочной сыворотки в биомассе цианобактерий было следующее содержание белка и сахаров: у *S. subsalsa* PCC 9445 – 35,47 и 17,22 %, а у *A. platensis* PCC 9223 – 32,22 и 23,23 % соответственно. При использовании модифицированного ретентата в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 содержание белка и сахаров было еще выше и составило 41,35 и 27,25 %, а в биомассе *A. platensis* PCC 9223 – 37,23 и 39,43 % соответственно. Содержание липидов варьировало в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 с 9,67 до 15,39 %, *A. platensis* PCC 9223 – с 11,01 до

13,01 % при применении оригинального либо модифицированного ретентата молочной сыворотки.

Результаты исследования также показали различия между изучаемыми видами цианобактерий. Так, цианобактерия *S. subsalsa* PCC 9445 была более чувствительна к применению среды, обогащенной ретентатом молочной сыворотки после криоконсервации (рис. 2, а). Это может быть связано с отзывчивостью штамма, его особенностями, в том числе видовыми. Таким образом, применение для обогащения разбавленной питательной среды Заррука модифицированного ретентата молочной сыворотки позволило увеличить содержание общего белка и редуцирующих сахаров в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 на 14,67 и 4,69 % соответственно по сравнению с применением оригинального ретентата молочной сыворотки (рис. 2, а). Содержание общего белка и редуцирующих сахаров в биомассе *A. platensis* PCC 9223, выращенной после криоконсервации в присутствии модифицированного ретентата молочной сыворотки, было выше на 11,99 и 9,16 % соответственно по сравнению с выращенной в присутствии оригинального ретентата молочной сыворотки (рис. 2, б).

Наши данные согласуются с результатами исследования Chang и соавт. [2013], в котором в биомассе цианобактерии *A. maxima*, выращенной на разбавленной до 30 % сточной воде завода по переработке молока, содержалось 65,2 % белка, 11,3 % сахаров и 7,0 % липидов, тогда как биомасса этой цианобактерии, выращенная на минеральной среде, имела 72,5 % белка, 8,3 % сахаров и 6,3 % липидов.

В то же время в статье Vieira Salla с соавт. [2016] приводятся данные о том, что добавление ретентата в стандартную питательную среду Заррука не влияло на содержание в биомассе белка и сахаров, а при культивировании цианобактерий на разбавленной до 20 % питательной среде и добавлении 2,5 % ретентата молочной сыворотки происходило снижение содержания в биомассе белка (26,44 %) и увеличение содержания сахаров (на 17,24 %). Авторы связывают полученные результаты с содержанием лактозы в ретентате молочной сыворотки, которая, сама являясь сахаром, может повлиять на содержание сахаров и липидов в биомассе цианобактерий, а также разбавлением питательной среды Заррука, что привело к ограничению азота и перенаправлению фотоассимилированного углерода на синтез углеводов вместо белков и пигментов [Vieira Salla et al., 2016].

Более высокое содержание белка и пигментов в биомассе цианобактерий фиксируется в условиях достаточного количества азота в пи-

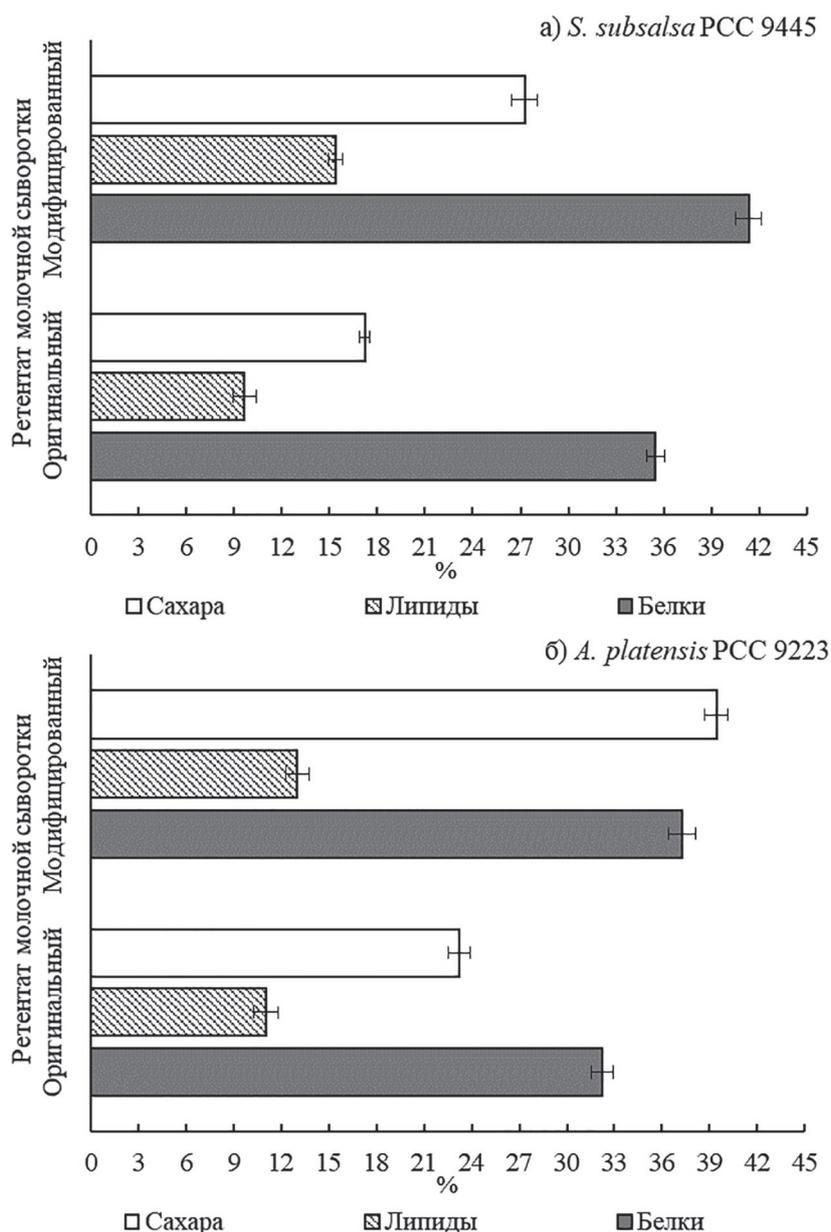


Рис. 2. Содержание суммарного количества белка, редуцирующих сахаров и общих липидов (%) в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 (а) и *A. platensis* PCC 9223 (б), выращенной после криоконсервации в присутствии ретентата молочной сыворотки (по сравнению с культивацией без добавления ретентата)

Fig. 2. Contents of total protein amount, reducing sugars and total lipids (%) in biomass of *S. subsalsa* PCC 9445 (a) & *A. platensis* PCC 9223 (б), grown after cryostorage in the presence of whey retentate (in comparison to cultivation without retentate of whey)

тательной среде. Сохранить высокое содержание белка в биомассе цианобактерий после криоконсервации представлялось крайне важным, поскольку целью является производство биомассы цианобактерий с высоким содержанием продуктов синтеза, то есть с высокими питательными характеристиками. В нашем исследовании сохранение высокого содержа-

ния белка в биомассе рекультивированных цианобактерий свидетельствует о достаточном содержании азота в исследуемых питательных средах, что достигалось благодаря применению модифицированного ретентата молочной сыворотки.

Также помимо сахаров, белков и липидов представлялось важным определить влияние

Таблица 4. Содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий

Table 4. Phenolic compounds content in biomass

| Ретентат молочной сыворотки Retentate of whey | Фенольные соединения (мг/г биомассы цианобактерий) Phenolic compounds (mg/g of biomass) | |
|--|--|------------------------------|
| | <i>S. subsalsa</i> PCC 9445 | <i>A. platensis</i> PCC 9223 |
| Без ретентата (разбавленная среда Заррука) Without retentate of whey (diluted Zarrouk's medium) | 2,17 ± 0,23 | 1,34 ± 0,15 |
| Оригинальный Original | 3,11 ± 0,22 | 2,41 ± 0,25 |
| Модифицированный Modified | 3,93 ± 0,20 | 3,28 ± 0,27 |

добавления к питательной среде Заррука ретентата молочной сыворотки на содержание фенольных соединений в биомассе *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации. Фенольные соединения, помимо того что являются антиоксидантами, что крайне важно для спирулины как пищевой добавки, могут способствовать увеличению срока хранения биомассы спирулины как продукта. Добавление к разбавленной питательной среде Заррука ретентата молочной сыворотки привело к повышению выработки фенольных соединений в биомассе цианобактерий (табл. 4). Так, добавление ретентата к культивируемой среде в 1,4–1,8 раза увеличило содержание фенольных соединений в биомассе *S. subsalsa* и в 1,8–2,4 раза у *A. platensis*.

Однако в отличие от сахаров, липидов и белков использование модифицированного ретентата молочной сыворотки более значительно повлияло на содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий после криоконсервации в сравнении с культурами, выращенными в присутствии оригинального ретентата молочной сыворотки. При использовании модифицированного состава ретентата молочной сыворотки биомасса цианобактерий после криоконсервации имеет более высокие количественные значения содержащихся фенольных соединений по сравнению с этими значениями в культуре цианобактерий, выращенной с оригинальным ретентатом молочной сыворотки (на 26,36 и 36,00 % для *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 соответственно). Эти результаты можно объяснить более высоким содержанием азота в среде с добавлением модифицированного ретентата молочной сыворотки, так как азот, необходимый для синтеза ароматических аминокислот, может играть важную роль в биосинтезе фенольных соединений. Полученные данные подтверждают работы исследователей, в которых показано положительное влияние концентрации азота

в питательной среде на содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий рода *Arthrospira* [Colla et al., 2007a, b; Abd El-Baky et al., 2009].

Заключение

Таким образом, результаты нашего исследования показали возможность применения для рекультивирования исследуемых цианобактерий после криоконсервации разбавленной (1:1) среды Заррука, используемой при рекультивировании цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации. Полученные данные подтвердили эффективность применения ретентата молочной сыворотки для обогащения среды Заррука при рекультивировании цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации. Было показано, что выращивание цианобактерий после криоконсервации на разбавленной среде Заррука с добавлением ретентата молочной сыворотки способствовало увеличению содержания таких важных соединений, как редуцирующие сахара, липиды, белок, а также фенольных соединений в биомассе цианобактерий. При этом наибольшее увеличение концентрации указанных соединений в биомассе цианобактерий можно получить за счет использования модифицированного ретентата молочной сыворотки, что объясняется повышенным содержанием азота (до 4610 мг/л) и большим содержанием биологически значимых элементов, таких как Zn, Fe, Cu, Mn.

Полученные результаты применения питательной среды, обогащенной ретентатом молочной сыворотки, могут также указывать на антистрессовый эффект, вероятно, за счет содержащихся в такой среде компонентов, по отношению к рекультивируемым цианобактериям. Возможно, выращивание цианобактерий сразу после оттаивания на питательной

среде с молочной сывороткой помогает клеткам этих микроорганизмов восстанавливаться после криоконсервации. Поскольку, согласно литературным данным, для ряда бактерий стресс после криоконсервации сохраняется в течение нескольких делений.

Следует также отметить и значительную экономическую выгоду от использования разбавленной (в два раза) питательной среды Заррука с добавлением в эту среду молочной сыворотки, недорогого побочного продукта молочной промышленности, снижающего стоимость среды при высокой эффективности рекультивирования цианобактерий после криоконсервации с повышением содержания белков, сахаров, липидов и фенольных соединений в биомассе.

Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации для обучения за рубежом аспирантов российских вузов, стипендией MULTIC от международной стипендиальной программы ERASMUS MUNDUS Action 2 и стипендией Дрезденского технического университета для развития научной карьеры у женщин (Scholarship Program for the Promotion of Early-Career Female Scientists of TU Dresden).

Литература

Abd El-Baky H. H. A., El Baz F. K., El-Baroty G. S. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects // Afr. J. Biotechnol. 2009. Vol. 8, no. 24. P. 7059–7067.

Belay A., Kato T., Ota Y. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement // J. Appl. Phycol. 1996. Vol. 8, no. 4–5. P. 303–311. doi: 10.1007/BF02178573

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, no. 1–2. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cantú-Lozano D., Molina-Quintero M., Del Bianchi V. L. Organic load removal of cheese whey in a photobioreactor of rotating disks with *Spirulina platensis* // Poster presented at XVII National Congress of Biotechnology and Bioengineering. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C. (Cancun, June, 23–28, 2013). Cancun, Mexico, 2013.

Chang W. T., Lee M., Den W. Simultaneous carbon capture, biomass production, and dairy wastewater purification by *Spirulina maxima* photobioreaction // Ind. Eng. Chem. Res. 2013. Vol. 52, no. 5. P. 2046–2055. doi: 10.1021/ie301932v

Chen Zh., Wang L., Qiu Sh., Ge Sh. Determination of microalgal lipid content and fatty acid for biofuel production // BioMed Res. Int. 2018. Vol. 2018. 17 p. doi: 10.1155/2018/1503126

Colla L. M., Furlong E. B., Vieira Costa J. A. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*

cultivated under different temperatures and nitrogen regimes // Braz. Arch. Biol. Tech. 2007a. Vol. 50, no. 1. P. 161–167. doi: 10.1590/S1516-89132007000100020

Colla L. M., Reinehr Ch. O., Reichert C., Vieira Costa J. A. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes // Bioresource Tech. 2007b. Vol. 98. P. 1489–1493. doi: 10.1016/j.biortech.2005.09.030

Converti A., Scapazzoni S., Lodi A., Carvalho J. C. M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 33, no. 1. P. 8–16. doi: 10.1007/s10295-005-0025-8

Eriksen N. T. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 80, no. 1. P. 1–14. doi: 10.1007/s00253-008-1542-y

Golmakani M.-T., Rezaei K., Mazidi S., Razavi S. H. Effect of alternative C₂ carbon sources on the growth, lipid, and γ -linolenic acid production of spirulina (*Arthrospira platensis*) // Food Sci. Biotechnol. 2012. Vol. 21, no. 2. P. 355–363. doi: 10.1007/s10068-012-0047-8

Joshi M., Kaur K., Mishra T., Singh S. To evaluate Lab-scale Cultivation of *Spirulina* by using different substrates and to evaluate its chlorophyll and protein content // Int. Res. J. Biol. Sci. 2014. Vol. 3, no. 1. P. 22–30.

Knight J. A., Anderson S., Rawle J. M. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids // Clinical Chem. 1972. Vol. 18, no. 3. P. 199–202.

Koru E. Earth Food *Spirulina* (*Arthrospira*): Production and quality standards // Food Additive. 2012. P. 191–202. doi: 10.5772/31848

Loftus S. E., Johnson Z. I. Cross-study analysis of factors affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production // Algal Res. 2017. Vol. 24, pt. A. P. 154–166. doi: 10.1016/j.algal.2017.03.007

Madkour F. F., Kamil A. El-W., Nasr H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media // Egypt. J. Aquatic Res. 2012. Vol. 38. P. 51–57. doi: 10.1016/j.ejar.2012.09.003

Margarites A. C. F., Costa J. A. V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production // Int. J. Eng. Res. Appl. 2014. Vol. 4, no. 11 (ver. 3). P. 80–86.

Markou G., Angelidaki I., Nerantzis E., Georgakakis D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* // Energies. 2013. Vol. 6. P. 3937–3950. doi: 10.3390/en6083937

Mezzomo N., Saggiorato A. G., Siebert R., Tatsch P. O., Lago M. C., Hemkemeier M., Costa J. A. V., Bertolin T. E., Colla L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater // Ciência e tecnologia de alimentos. 2010. Vol. 30, no. 1. P. 173–178. doi: 10.1590/S0101-20612010000100026

Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. 1959. Vol. 31. P. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030

Morocho-Jácome A. L., Mascioli G. F., Sato S., de Carvalho J. C. M. Evaluation of physicochemical treatment conditions for the reuse of a spent growth medium in *Arthrospira platensis* cultivation

// Algal Res. 2016a. Vol. 13. P. 159–166. doi: /10.1016/j.algal.2015.11.022

Morocho-Jácome A. L., Sato S., de Carvalho J. C. M. Ferric sulfate coagulation and powdered activated carbon adsorption as simultaneous treatment to reuse the medium in *Arthrospira platensis* cultivation // J. Chem. Technol. Biot. 2016b. Vol. 91, no. 4. P. 901–910. doi: 10.1002/jctb.4655

Olguín E., Galicia S., Angulo-Guerrero O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste // Bioresource Technol. 2001. Vol. 77. P. 19–24. doi: 10.1016/S0960-8524(00)00142-5

Raouf B., Kaushik B. D., Prasanna R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina* // Biomass and Bioenergy. 2006. Vol. 30. P. 537–542. doi: 10.1016/j.biombioe.2005.09.006

Sili C., Torzillo G., Vonshak A. *Arthrospira* (*Spirulina*). Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time / Ed. B. Whitton. New York; London: Springer Dordrecht Heidelberg, 2012. P. 677–705. doi: 10.1007/978-94-007-3855-3_25

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocal-

teu reagent // Methods in Enzymology. Academic Press, 1999. Vol. 299. P. 152–178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // Am. J. Enol. Vitic. 1965. Vol. 16. P. 144–153.

Vieira Salla A. C., Margarites A. C., Seibel F. I., Holz L. C., Brião V. B., Bertolin T. E., Colla L. M., Vieira Costa J. A. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate // Bioresource Technol. 2016. Vol. 209. P. 133–141. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.069

Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. London: CRC Press, 2002. 252 p.

Zöllner N., Kirsch K. Z. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulphosphovanillin-Reaktion // Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin. 1962. Vol. 135, no. 6. P. 545–561.

Поступила в редакцию 10.09.2018

References

Abd El-Baky H. H. A., El Baz F. K., El-Baroty G. S. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *Afr. J. Biotechnol.* 2009. Vol. 8, no. 24. P. 7059–7067.

Belay A., Kato T., Ota Y. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. *J. Appl. Phycol.* 1996. Vol. 8, no. 4–5. P. 303–311. doi: 10.1007/BF02178573

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, no. 1–2. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cantú-Lozano D., Molina-Quintero M., Del Banchi V. L. Organic load removal of cheese whey in a photobioreactor of rotating disks with *Spirulina platensis*. Poster presented at XVII National Congress of Biotechnology and Bioengineering. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C. (Cancun, June, 23–28, 2013). Cancun, Mexico, 2013.

Chang W. T., Lee M., Den W. Simultaneous carbon capture, biomass production, and dairy wastewater purification by *Spirulina maxima* photobioreaction. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013. Vol. 52, no. 5. P. 2046–2055. doi: 10.1021/ie301932v

Chen Zh., Wang L., Qiu Sh., Ge Sh. Determination of microalgal lipid content and fatty acid for biofuel production. *BioMed Res. Int.* 2018. Vol. 2018. 17 p. doi: 10.1155/2018/1503126

Colla L. M., Furlong E. B., Vieira Costa J. A. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 2007a. Vol. 50, no. 1. P. 161–167. doi: 10.1590/S1516-89132007000100020

Colla L. M., Reinehr Ch. O., Reichert C., Vieira Costa J. A. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Tech.* 2007b. Vol. 98. P. 1489–1493. doi: 10.1016/j.biortech.2005.09.030

Converti A., Scapazzoni S., Lodi A., Carvalho J. C. M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 33, no. 1. P. 8–16. doi: 10.1007/s10295-005-0025-8

Eriksen N. T. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 80, no. 1. P. 1–14. doi: 10.1007/s00253-008-1542-y

Golmakani M.-T., Rezaei K., Mazidi S., Razavi S. H. Effect of alternative C₂ carbon sources on the growth, lipid, and γ -linolenic acid production of *spirulina* (*Arthrospira platensis*). *Food Sci. Biotechnol.* 2012. Vol. 21, no. 2. P. 355–363. doi: 10.1007/s10068-012-0047-8

Joshi M., Kaur K., Mishra T., Singh S. To evaluate Lab-scale Cultivation of *Spirulina* by using different substrates and to evaluate its chlorophyll and protein content. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2014. Vol. 3, no. 1. P. 1–9.

Knight J. A., Anderson S., Rawle J. M. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical Chem.* 1972. Vol. 18, no. 3. P. 199–202.

Koru E. Earth Food *Spirulina* (*Arthrospira*): Production and quality standards. *Food Additive.* 2012. P. 191–202. doi: 10.5772/31848

Loftus S. E., Johnson Z. I. Cross-study analysis of factors affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production. *Algal Res.* 2017. Vol. 24, pt A. P. 154–166. doi: 10.1016/j.algal.2017.03.007

Madkour F. F., Kamil A. El-W., Nasr H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egypt. J. Aquatic Res.* 2012. Vol. 38. P. 51–57. doi: 10.1016/j.ejar.2012.09.003

Margarites A. C. F., Costa J. A. V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. *Int. J. Eng. Res. Appl.* 2014. Vol. 4, no. 11 (ver. 3). P. 80–86.

Markou G., Angelidaki I., Nerantzis E., Georgakakis D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Energies*. 2013. Vol. 6. P. 3937–3950. doi: 10.3390/en6083937

Mezzomo N., Saggiorato A. G., Siebert R., Tatsch P. O., Lago M. C., Hemkemeier M., Costa J. A. V., Bertolin T. E., Colla L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis (Arthrospira platensis)* from biological treatment of swine wastewater. *Ciência e tecnologia de alimentos*. 2010. Vol. 30, no. 1. P. 173–178. doi: 10.1590/S0101-20612010000100026

Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959. Vol. 31. P. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030

Morocho-Jácome A. L., Mascioli G. F., Sato S., de Carvalho J. C. M. Evaluation of physicochemical treatment conditions for the reuse of a spent growth medium in *Arthrospira platensis* cultivation. *Algal Res.* 2016a. Vol. 13. P. 159–166. doi: 10.1016/j.algal.2015.11.022

Morocho-Jácome A. L., Sato S., de Carvalho J. C. M. Ferric sulfate coagulation and powdered activated carbon adsorption as simultaneous treatment to reuse the medium in *Arthrospira platensis* cultivation. *J. Chem. Technol. Biot.* 2016b. Vol. 91, no. 4. P. 901–910. doi: 10.1002/jctb.4655

Olguín E., Galicia S., Angulo-Guerrero O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on di-

gested pig waste. *Bioresource Technol.* 2001. Vol. 77. P. 19–24. doi: 10.1016/S0960-8524(00)00142-5

Raouf B., Kaushik B. D., Prasanna R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*. 2006. Vol. 30. P. 537–542. doi: 10.1016/j.biombioe.2005.09.006

Sili C., Torzillo G., Vonshak A. *Arthrospira (Spirulina)*. Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. Eds. B. Whitton. New York; London: Springer Dordrecht Heidelberg, 2012. P. 677–705. doi: 10.1007/978-94-007-3855-3_25

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1999. Vol. 299. P. 152–178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965. Vol. 16. P. 144–153.

Vieira Salla A. C., Margarites A. C., Seibel F. I., Holz L. C., Brião V. B., Bertolin T. E., Colla L. M., Vieira Costa J. A. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technol.* 2016. Vol. 209. P. 133–141. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.069

Vonshak A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. London: CRC Press, 2002. 252 p.

Zöllner N., Kirsch K. Z. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*. 1962. Vol. 135, no. 6. P. 545–561.

Received September 10, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Петрухина Дарья Игоревна

ассистент кафедры
Калужский государственный университет
имени К. Э. Циолковского
ул. Степана Разина, 26, Калуга, Россия
эл. почта: daria.petrukhina@outlook.com

CONTRIBUTOR:

Petrukhina, Daria

Tsiolkovsky Kaluga State University
26 Stepan Razin St., Kaluga, Russia
e-mail: daria.petrukhina@outlook.com