УДК: 561.22.232:57.083.134/138

В.Ф. РУДИК[1], В.П. БУЛЬМАГА[2], С.В. МАКСАКОВА[2]

[1]Ин-т микробиологии и биотехнологии АН РМ,
MD 2009 Кишинэу, ул. Академией, 1, Молдова
[2]Государственный ун-т Республики Молдова,
MD 2009 Кишинэу, ул. Матеевича, 60, Молдова

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *SPIRULINA PLATENSIS* GEITL. (*CYANOPHYTA*) МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Путем полного факторного эксперимента выполнена оптимизация состава питательной среды для культивирования *Spirulina platensis* Geitl. Введение в среду селена (Na_2SeO_3), германия (GeO_2) и йода (KI) значительно улучшило питательную ценность биомассы. На оптимизированной среде продуктивность составляла 1,55-1,60 г/л за 6 дней культивирования.

Ключевые слова: полный факторный эксперимент, *Spirulina platensis*, оптимизация питательной среды, Na_2SeO_3, GeO_2, KI, ценный биохимический состав.

Введение

В последнее время существенно возрос интерес к массовому культивированию синезеленой водоросли *Spirulina platensis* Geitl., биомассу которой используют как компонент биологически активных добавок (БАД) к пище и как ценное сырье для изготовления биофармацевтических препаратов (Сиренко, Сакевич, 1985; Rudic 1993; Тренкеншу, Дробецкая, 2000; Popova et al., 2001).

Биомасса *S. platensis* может быть использована для получения ценного белка, фикобилипротеинов в пищевой и косметической промышленности, а также в качестве пищевых добавок, изготовления фармацевтических препаратов (Гореликова и др., 1997; Tao, Bolger, 1997). Особенно перспективным является включение в состав БАД биодоступного селена, являющегося эффективным антиоксидантом (Rudic, 1993), и германия, являющегося антиканцерогенным веществом (Tao, Bolger 1997). Пищевые добавки, содержащие в небольших дозах германий, эффективны при лечении рака и др. заболеваний (Suzuki, 1985; Suzuki et al., 1986; Suzuki, 1987). Германий стимулирует выработку организмом интерферона, противораковых агентов и укрепляет иммунную систему, повышая активность клеток убийц (белые кровяные тела), которые атакуют чужеродные микроорганизмы.

В ряде работ детально охарактеризованы процессы накопления селена клетками *S. platensis* и описано влияние различных концентраций селена на ее рост (Минюк, Дробецкая, 2000; Huang et al., 2002; Zhi-Yong Li et al., 2003). Группой китайских исследователей было показано, что концентрации селенита натрия менее 400 мг/л стимулируют рост спирулины, причем наиболее выражен этот эффект в диапазоне концентраций 5-40 мг/л (Zhi-Yong Li et al., 2003).

Однако при концентрации селенита натрия выше 500 мг/л отмечается его токсическое действие на рост культуры. В работах Прониной Н.А. и др. (2002) указана максимально допустимая концентрация селенита натрия в среде, не превышающая 170 мг/л. Возможная токсичность селена для *S. platensis* зависит от pH-среды и содержания в ней сульфита. Такие расхождения резуль-татов могут объясняться, по-видимому, различиями в условиях культивации и использованными штаммами спирулины.

Одна из возможных причин устойчивости спирулины к летальным для абсолютного большинства микроводорослей дозам селена может заключаться в их способности секретировать экстрацеллюлярные полианионные полисахариды, адсорбирующие селениты на своей поверхности, тем самым частично предотвращая проникновение внутрь селена в токсических концентрациях (Минюк, Дробецкая, 2000).

Неорганический селен трансформируется в органический, связываясь с белками, липидами и полисахаридами, а также с другими компонентами клетки (Sunde, 1990; Тамбиев, Кирикова, 2000; Zhi-Yong Li et al., 2003).

Таким образом, влияние селена на рост спирулины изучено достаточно, влияние йода описано в работах Л.М. Мосулишвили с соавт. (Мосулишвили и др., 2001; Mosulishvili et al., 2001), о влиянии соединений германия сведений в литературе практически нет.

Германий аккумулируется в клеточной стенке растений, а также на уровне протопласт (Loomis, Durst, 1992; Nuttall, 2002). Транспорт германия осуществляется путем пассивного прохождения через клеточную мембрану (Nuttall, 2002).

Накопление йода и селена в биомассе спирулины зависит от концентрации этих соединений в среде (Paoletti et al., 1971; Саттыев, 1985; Edmonds, Morita, 1998; Mosulishvili et al., 2001). Поскольку увеличение их концентраций приводит к снижению продуктивности, необходимо найти оптимальные концентрации соединений, при которых происходит накопление элементов в биомассе, а продуктивность не снижается.

Обогащение спирулины важнейшими микроэлементами, такими как селен, германий и йод, путем направленного синтеза при ее культивировании в присутствии соединений этих элементов позволяет получать биомассу с более ценным биохимическим составом (Wong, Oliveira, 1991; Popova et al., 2001; Zhi-Yong Li et al., 2003).

Цель данной работы – определить оптимальные концентрации селенита натрия, окиси германия и йодида калия методом математического планирования эксперимента для оптимизации состава среды (Максимов, Федоров, 1969).

Материалы и методы

Объектом исследования был штамм *Spirulina platensis* Geitl. Calu-835, хранящийся в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Ин-та микробиологии и биотехнологии АН Республики Молдова.

Для культивирования использовали питательную среду Заррука с определенным соотношением макро- и микроэлементов (Семененко, 1991).

Культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера с объемом культуральной жидкости 100 мл, в течение 144 ч, при температуре 30 ± 1 ^{o}C, освещении 2000-4000 лк, pH среды 9,5-10.

В питательную среду вводили дополнительно селен Na_2SeO_3, германий GeO_2 и йод KI, для определения оптимальных концентраций которых использовали метод математического планирования эксперимента. Данный метод позволяет одновременно изучить действие нескольких факторов и их взаимодействие, а также количественно оценить степень этого влияния (Максимов и др., 1976).

Исследования проводили в два этапа:

1) полный факторный эксперимент ПФЭ ^{2};

2) оптимизация среды по методу крутого восхождения Бокса-Уилсона.

Результаты опытов подвергали статистической обработке: вычисляли дисперсии средних значений, ошибки опытов, рассчитывали уравнения регрессии с помощью алгоритма Йетса, а также их адекватность с использованием критериев Стьюдента и Фишера (Максимов, Федоров, 1969).

Также был проведен сравнительный биохимический анализ биомассы, выращенной на обычной и модифицированной среде Заррука. При этом использовали метод определения белка и пептидов Лоури (Lowry, 1951), аминокислот по реакции свободных аминогрупп с тринитробезосульфокислотой (Langner et al., 1971) и метод определения β-каротина (Neamţu, Tămaş, 1986). Определение фикобилипротеинов осуществляли по методу Boussiba and Richmond (1980) в нашей модификации, так как для правильного расчета фикоцианина необходимо учитывать вклад аллофикоцианина при длине волны 620 нм, что было упущено данными авторами (Rudic et al., 2002).

Содержание селена и германия определяли согласно методикам, описанным в литературе (Назаренко, Антонович, 1973; Бабко, 1982), йода – по методу инверсионной вольтамперометрии.

Результаты и обсуждение

Зависимость интенсивности процесса (выхода биомассы) от влияния нескольких факторов (введенных в питательную среду соединений) можно представить как: $y = f (x_1, x_2, x_3, \ldots x_n)$. Для описания этой функции использовали уравнение регрессии, причем в случае решения задачи оптимизации ограничивались линейной моделью (Максимов, Федоров, 1969). Таким образом, для трех переменных x_1, x_2, x_3 уравнение регрессии имеет вид:

$$y = b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3,$$

где b_1, b_2, b_3 – коэффициенты регрессии.

Величина коэффициента регрессии характеризует степень влияния соответствующего фактора на процесс.

В основе планирования этого эксперимента лежит реализация всех возможных комбинаций исследуемых нами трех факторов (Na_2SeO_3 – x_1, GeO_2 –x_2

и KI – x_3), каждый из которых испытывали одновременно и независимо друг от друга на двух уровнях: верхнем (+) и нижнем (-).

Кодификация факторов и план эксперимента 2^3, включая все возможные комбинации исследуемых нами трех факторов (Na_2SeO_3 – x_1, GeO_2 – x_2 и KI – x_3), представлены в табл. 1.

Таблица 1. **Кодификация факторов и планирование эксперимента 2^3**

Фактор	Кодификация	Уровень концентраций (мг/л)		Номер опыта							
		мин. (-)	макс. (+)	1	2	3	4	5	6	7	8
Na_2SeO_3	x_1	1	20	-	+	-	+	-	+	-	+
GeO_2	x_2	0,5	10	-	-	+	+	-	-	+	+
KI	x_3	0,5	5	-	-	-	-	+	+	+	+

Для расчета дисперсии (σ) каждый опыт осуществляли в трех повторностях, на основе которых получали необходимые для 5 % уровня значимости результаты, по которым определяли дисперсию воспроизводимости результатов, а с учетом критерия Стьюдента – и предел значимости коэффициентов регрессии. Расчет коэффициентов регрессии осуществляли по методу Йетса (Максимов, Федоров 1969), что позволило определять и взаимодействие факторов. Так, результаты изучения всех возможных комбинаций между исследуемыми нами тремя факторами при их введении в питательную среду для спирулины (Na_2SeO_3 – x_1, GeO_2 – x_2 и KI – x_3), а также коэффициенты регрессии представлены в табл. 2.

Таблица 2. **Результаты полного факторного эксперимента 2^3**

Номер опыта	Выход биомассы, г/л	Коэффициент регрессии, b_i	
1	1,50±0,05	b_0	1,36
2	1,52±0,03	b_1	0
3	1,22±0,03	b_2	-0,11
4	1,23±0,02	b_{12}	0
5	1,44±0,01	b_3	0
6	1,41±0,03	b_{13}	0
7	1,27±0,04	b_{23}	0,03
8	1,28±0,03	B_{123}	0
b_i			0,02
σ_y			0,01
$\sigma_{ад}$			0,017
F			4,1
$\sigma_{ад} < \sigma_y * F$			0,02 < 0,07

Коэффициенты регрессии являются мерой влияния фактора на накопление биомассы. Следовательно, если величина коэффициента мало отличается от нуля, то данный фактор не оказывает существенного влияния на процесс, и изменение выхода процесса (биомассы) с изменением уровня соответствующего фактора измеримо с ошибкой его определения. Коэффициенты значимы, если соблюдается неравенство Фишера (Максимов, Федоров, 1969).

Как видно из табл. 2, значимыми являются только три коэффициента регрессии. Исходя из этих данных, полученное нами уравнение регрессии имеет вид:

$$y = 1,36-0,11x_2+0,03\ x_2x_3.$$

Уравнение адекватно, т.к. соблюдено условие адекватности (см. табл. 2).

$$\sigma_{ад}< \sigma_{y*}\ F.$$

Уравнение включает в себя фактор x_2 – GeO_2, причем с отрицательным знаком, что свидетельствует об ингибирующем влиянии этого фактора на рост культуры. Это влияние составляет 7,3 % выхода биомассы. Кроме того, германий влияет на продуктивность еще и косвенно, через взаимодействие с KI (x_3). Это влияние положительно и не очень значимо – 2 % потенциального выхода биомассы *S. platensis.*

Поскольку уравнение адекватно, в дальнейшем мы использовали его как интерполяционную формулу для определения направления градиента функции «у» непосредственно по величине коэффициентов регрессии при линейных членах. Для того, чтобы двигаться в направлении градиента, необходимо изменение факторов пропорционально полученным для них коэффициентам регрессии с учетом их знака.

В табл. 3 приведены расчеты поиска оптимальных уровней изученных факторов по методу крутого восхождения Бокса-Уилсона. Способ расчета включал ряд последовательных операций (Максимов, Федоров, 1969).

Полученные результаты (табл. 4; рисунок) показывают, что уравнение, использованное в качестве интерполяционной модели, попадает в диапазон эффективных концентраций Na_2SeO_3, GeO_2, KI, а экспериментальные данные, по сравнению с данными, рассчитанными теоретически (по уравнению), не расходятся больше, чем на одну дисперсию.

По мере снижения концентрации GeO_2 происходит увеличение продуктивности спирулины. Так как концентрация GeO_2 менее 3 мг/л не оказывает существенного влияния на продуктивность, оптимальной можно считать концентрацию GeO_2 2,5 мг/л.

Биомасса спирулины, выращенная на модифицированной среде (в присутствии Na_2SeO_3, GeO_2, KI), отличается более ценным биохимическим составом, хотя продуктивность находится на уровне продуктивности культуры, выращенной на питательной среде Заррука.

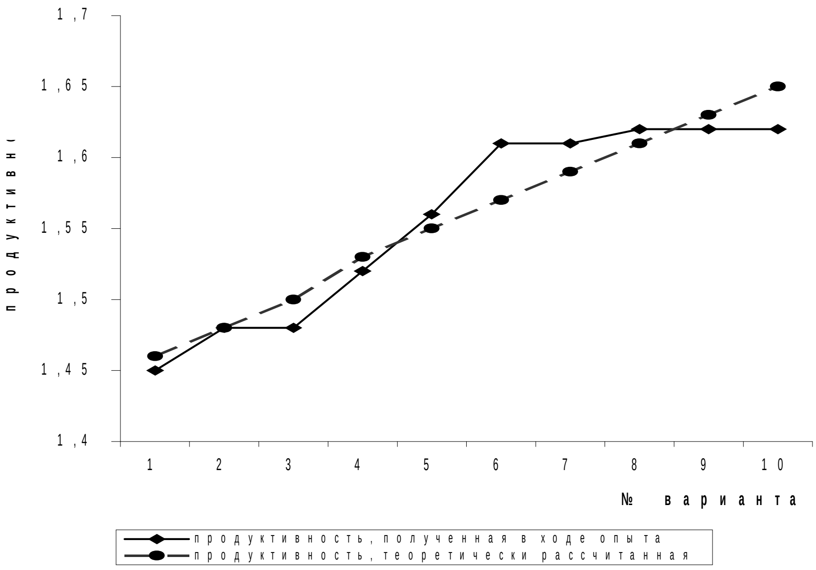

Рисунок. Изменение продуктивности *Spirulina platensis* в присутствии Na_2SeO_3, GeO_2, KI

Таблица 3. **Расчеты оптимальных уровней факторов по методу крутого восхождения**

Фактор	x_1 – Na_2SeO_3	x_2 – GeO2	x_3 – KI
Основной уровень	1	0,5	0,3
Единица варьирования, Λ*i*	1	0,05	0,05
b*i*	0	-0,11	0
Λ*i* b*i*	-	-0,0055	-
K*i*	-	-1	-
Λ= K*i* Λ*i*	-	-0,05	-
Номер опыта	Концентрации (шаги факторов), мг/л		
1	1	0,5	0,3
2	1	0,45	0,3
3	1	0,4	0,3
4	1	0,35	0,3
5	1	0,3	0,3
6	1	0,25	0,3
7	1	0,2	0,3
8	1	0,15	0,3
9	1	0,1	0,3
10	1	0,05	0,3

Таблица 4. **Результаты экспериментов по методу крутого восхождения**

Номер опыта	Выход биомассы, г/л	
	по опыту	по уравнению
1	1,45±0,03	1,46
2	1,48±0,02	1,48
3	1,48±0,02	1,50
4	1,52±0,04	1,53
5	1,56±0,03	1,55
6	1,61±0,03	1,57
7	1,61±0,02	1,59
8	1,62±0,04	1,61
9	1,62±0,03	1,63
10	1,62±0,04	1,65

В биомассе, выращенной на модифицированной среде, при близких значениях содержания аминокислот и пептидов, белка больше на 11 %, значительно больше фикобилипротеинов (на 25 %). Содержание β-каротина находится на одинаковом уровне, что может свидетельствовать о том, что введенные в среду микроэлементы (Na_2SeO_3, GeO_2, KI) не оказывают стрессового влияния на развитие спирулины (табл. 5).

Таблица 5. **Биохимический состав биомассы *Spirulina platensis*, выращенной на модифицированной среде (в присутствии Na_2SeO_3, GeO_2, KI)**

Белковый и пигментный состав	Содержание биохимических компонентов, %	
	Модифицированная среда	Среда Заррука
Белок	71,00±0,26	63,97±0,17
Пептиды	7,60±0,15	7,60±0,08
Аминокислоты	5,78±0,22	5,33±0,18
Фикобилипротеины	21,20±0,7	16,9±0,59
фикоцианин	12,53±0,435	9,3±0,32
аллофикоцианин	8,67±0,30	7,6±0,13
β-каротин	0,35±0,02	0,34±0,01
Продуктивность, г/л	1,55±0,05	1,60±0,02

Определено также содержание селена, германия и йода в биомассе *S. platensis:* селен – 0,97 мг %, германий – 30,48 мг %, йод – 0,106 мг %.

В результате проведенных исследований разработана питательная среда, содержащая дополнительно селен, йод и германий в виде соединений Na_2SeO_3, GeO_2 и KI:

Макроэлементы, г/л: $NaNO_3$ – 2,5; $NaHCO_3$ – 16,8; NaCl – 1,0; K_2SO_4 – 1,0; $MgSO_4$ – 0,2; Na_2HPO_4 – 0,2; $CaCl_2$ – 0,024; FeEDTA – 0,025.

Микроэлементы, г/л. *Вар. 1*: HBO_3 – 2,860; $MnCl_2$ x $4H_2O$ – 1,810; $ZnSO_4$ x $7H_2O$ – 0,220; $CuSO_4$ x $5H_2O$ – 0,080; MoO_3 – 0,015. *Вар. 2*: NH_4VO_3 – 0,023; $K_2Cr_2(SO_4)_4$ x $12H_2O$ – 0,096; $NiSO_4$ x $7H_2O$ – 0,048; Na_2WO_4 x $2H_2O$ – 0,018; $Ti_2(SO)_4$ – 0,040; $Co(NO_3)2$ x $6H_2O$ – 0,044.

Микроэлементы (1-й и 2-й вар.) – по 1 мл/л. Микроэлементы, веденные в среду дополнительно, г/л: Na_2SeO_3 – 0,01; GeO_2 – 0,0025; KI – 0,0030.

Заключение

Методом математического планирования эксперимента разработана питательная среда для культивирования спирулины на основе среды Заррука, которая позволяет получить биомассу, обогащенную такими микроэлементами, как селен, германий и йод с более ценным биохимическим составом. Эту среду можно применить для получения биомассы спирулины, обогащенной важными микроэлементами, и на ее основе – биологически активных добавок для профилактики и лечения некоторых заболеваний и повышения иммунитета. В дальнейшем такую среду можно применять для адаптирования спирулины к более высоким концентрациям селена, германия и йода.

V.F. Rudic[1], V.P. Bulimaga[2], S.V. Maxacova[2]

[1]Institute of Microbiology and Biotechnology, National Academy of Sciences of Moldova,
1, Academiei St., MD2009 Chishinau, Moldova
[2]State University of Moldova,
60, Mateevich St., MD2009 Chishinau, Moldova

OPTIMIZATION OF THE COMPOSITION OF NUTRITIVE MEDIUM FOR CULTIVATION *SPIRULINA PLATENSIS* GEITL. USING MATHEMATIC METHOD OF EXPERIMENT PLANNING

The full factorial experimental design used for optimization of the nutrient medium composition for cultivating *Spirulina platensis* Geitl. Optimization was carried out. The introduction into the medium of selenium (Na_2SeO_3), germanium (GeO_2), and iodine (KI) considerably improved the nutritive value of the biomass. Productivity on the optimized medium made up 1.55-1.60 g/L for six days of cultivation.

Keywords: full factorial experiment, *Spirulina platensis*, optimization of the nutrient medium, Na_2SeO_3, GeO_2, KI, valuable biochemical composition.

Бабко А.Т. Методы определения неметаллов. – М.: Наука, 1982. – 256 с.

Гореликова Г.А., Маюрникова Л.А., Позняковский В.М. // Вопр. питания. – 1997. – № 5. – С. 18-21.

Максимов В.Н., Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н. Оптимизация состава питательной среды методом планирования эксперимента // Практикум по микробиологии. – М., 1976. – С. 172-181.

Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента. – М.: МГУ, 1969. – 122 с.

Минюк Г.С., Дробецкая И.В. Влияние селена на жизнедеятельность морских и пресноводных микроводорослей // Экол. моря. – 2000. – Вып. 54. – С. 26-37.

Мосулишвили Л.М., Киркесали Е.И., Белокобыльский А.И. и др. Исследование возможности создания йодированных лечебно-профилактических препаратов на основе матрицы микроводоросли *Spirulina platensis* с использованием ядерно-физических методов анализа // Particles and Nuclei, Letters. – 2001. – № 4. – P. 110-117.

Назаренко В.А., Антонович В.П. Триоксифлуороны. – М.: Наука, 1973. – 182 с.

Пронина Н.А., Ковшова Ю.И., Попова В.В. и др. Влияние селенит-ионов на рост и накопление селена у *Spirulina platensis* // Физиол. раст. – 2002. – **49**. – № 2. – С. 264-271.

Саттыев Р., Каримова Х.М., Юсупова Э.Р., Зарипов Э. Влияние йода на рост спирулины // Промышленное культивирование микроводорослей. – М., 1985. – С. 108-110.

Семененко В.С. Каталог культур сред микроводорослей в коллекциях СССР. – М.: ИФР РАН, 1991. – 226 с.

Сиренко Л.А., Сакевич А.И. Получение из микроводорослей биологически активных и других ценных соединений // Промышленное культивирование микроводорослей. – М., 1985. – С. 63-65.

Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н. Аккумуляция селена микроводорослями и цианобактериями // Экол. моря. – 2000. – Вып. 54. – С. 38-41.

Тренкеншу Р.П., Дробецкая И.В. Влияние антогонизма серы и селена на рост и биохимические показатели спирулины // Там же. – С. 50-57.

Boussiba S., Richmond A.E. C-phycocyanin of the blue-green algae *Spirulina platensis* // Arch. Microbiol. – 1980. – **125**. – P. 143-147.

Edmonds J.S., Morita M. The determination of iodine species in environmental and biological samples // Pure & Appl. Chem. – 1998. – **70**, N 8. – P.1567-1584.

Huang Z., Zheng W.J., Guo B.J. Optimization of cultivation conditions in Se-enriched *Spirulina platensis* // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. – 2002. – **18**. – N 3. – P. 373-376.

Langner J., Ansorge S., Bohley P. et al. Intracellular protein breakdown. I. Aktivity determination of endopeptidase using protein substrates // Acta Biol. Med. Ger. – 1971. – **26**. – N 5. – P. 935-951.

Loomis W.D., Durst R.W. Chemistry and biology of boron // Biofactors. – 1992. – **4**, N 3. – P. 229-239.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265.

Mosulishvili L.M., Kirkesali E.I., Belokobylsky A.Y. et al. Experimental substations of the possibility of developing selenium and iodine containing pharmaceuticals based an blue-green algae *Spirulina platensis* // J. Pharm. Biomed Anal. – 2002. – **8**, N 22. – P. 87-97.

Neamţu G., Tămaş V. Pigmenţi carotenoidici şi metaboliţi. – Bucureşti, 1986. – Vol. 2.

Nuttall C.Y. Boron tolerance and uptake in higher plants. – Cambridge: Dep. Plant Sci. and Cornville and Coins College. – 2002. – 83 p.

Paoletti C. et al. Accumulation of iodine in *Spirulina platensis* // Agr. Ital. – 1971. – N 5. – P. 319-326.

Popova V.V., Kovshova J.I., Mazo V.K., Pronina N.A. // Accumulation of trace elements by *Spirulina platensis* // Abstr. Intern. Symp. “Plant under environmental stress.” – Moscow: Publ. House of People’s Friend. Univ., 2001. – P. 227-228.

Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. – Chişinău: Ştiinţa, 1993. – 140 p.

Rudic V., Gudumac V., Bulimaga V. et al. Metode de investigaţii în ficobiotehnologie. – Chişinău, 2002. – 60 p.

Sunde R.A. Molecular biology of selenoproteins // Ann. Rev. Nutr. – 1990. – N 10. – P. 451-474.

Suzuki F. Antitumor mechanism of carboxyethyl-1-germanium sesquioxide in mice bearing Ehrlich ascites tumors // Can To Kagaku Ryoho. – 1987. – **14**. **–** P. 127-134.

Suzuki F. Suppression of tumor growth by peritoneal macrophages isolated from mice treated carboxyethyl germanium sesquioxide // Ibid. – 1985. – **12**. – P. 2122-2128.

Suzuki F., Brutkiewicz R.P., Pollard R.B. Cooperation of lymphocyte (S) and macrophages in expression of antitimor activity of carboxyethypylgermanium sesquioxide // Antican. Res. – 1986. – **6**. – P. 177-186.

Tao S., Bolger P. Hazard assesment of germanium supplements // Reg. Toxicol Pharm. – 1997. – **3**, N 6. – P. 211-219.

Wong D., Oliveira L. Effects of selenite and selenate on the growth and motility of seven species of marine microalgae // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1991. – **48**, N 7. – P. 1193-1200.

Zhi-Yong Li, Si-Yuan Guo, Lin Li. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation // Biores. Techn. – 2003. – **9**, N 89. – P. 171-176.

Получена 08.02.07

Подписала в печать Е.И. Шнюкова