

Д.И. ПЕТРУХИНА

## Использование модифицированной среды Заррука для рекультивации цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после криоконсервации

Цель данного исследования состояла в оценке увеличения биомассы и содержания продуктов синтеза у цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после криоконсервации. Цианобактерии после оттаивания были рекультивированы в рециркулированной питательной среде Заррука, обогащенной ретенатом молочной сыворотки. В представленных условиях культивирования после криоконсервации было установлено увеличение биомассы, углеводов, белков, липидов, а также фенольных соединений у *S. subsalsa* и *A. platensis*. Отработанная среда Заррука с добавлением 2,0 % модифицированного либо оригинального ретената молочной сыворотки была пригодна для использования при рекультивации цианобактерий после криоконсервации. Полученные результаты исследований могут быть использованы для восстановления после криоконсервации различных культур цианобактерий.

Ключевые слова: *Arthrospira platensis*, *Spirulina subsalsa*, рекультивация, ретенат молочной сыворотки, рециклинг питательной среды.

**Use of modified Zarrouk medium for recultivation of cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Spirulina subsalsa* after cryopreservation.** D.I. PETRUKHINA (Tsiolkovsky Kaluga State University, Kaluga).

The aim of the study was to estimate the increase of biomass and synthesis products content of cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Spirulina subsalsa* after cryopreservation. Cyanobacteria have been recultivated after thawing in recycled Zarrouk medium with the additions of whey retentate. With these culture conditions, the increase in biomass, carbohydrates, proteins, lipids and phenolic compounds in *S. subsalsa* and *A. platensis* after cryopreservation has been determined. The recycled Zarrouk medium with the addition of 2.0 % of modified or original whey retentate has been appropriate for use to cyanobacteria recultivation after their cryopreservation. Investigation results obtained can be used for recovery after cryopreservation of different cyanobacteria cultures.

Key words: *Arthrospira platensis*, *Spirulina subsalsa*, recultivation, whey retentate, nutrient medium recycling.

### Введение

В целях снижения затрат при культивировании цианобактерий и микроводорослей представляется целесообразным повторное использование многокомпонентных

---

ПЕТРУХИНА Дарья Игоревна – аспирант (Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга). E-mail: daria.petrukhina@outlook.com

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации для обучения за рубежом аспирантов российских вузов, стипендии для аспирантов от международной стипендиальной программы ERASMUS MUNDUS Action 2 в целях развития сотрудничества между Европейским Союзом и Российской Федерацией (MULTIC) и стипендии Дрезденского технического университета для развития научной карьеры женщин.

питательных сред. Однако эксперименты по выращиванию культур в «отработанных» средах ведутся недостаточно интенсивно [13], результаты представлены лишь в нескольких работах Mogocho-Jácome с соавторами [15, 16]. Так, показано, что потребление цианобактериями основных питательных веществ из жидкой питательной среды Заррука обычно неполное, т.е. после выращивания и отделения полученной биомассы в культуральной среде присутствуют остаточные количества нитратов, фосфатов и карбонатов [15, 16]. Поэтому, после лишь частичного их восполнения, питательную среду Заррука можно использовать повторно [15, 16], например, по нашему предположению, для рекультивирования цианобактерий *Arthrospira* sp. и *Spirulina* sp. после криоконсервирования.

Ранее было показано, что миксотрофное культивирование в присутствии таких органических соединений, как глюкоза, этанол и уксусная кислота, приводит к повышению конечной биомассы цианобактерий [10]. Большое количество органических соединений присутствует также в молочной сыворотке – недорогом побочном продукте переработки молочного сыря [3], в связи с чем ее применение при культивировании микроорганизмов оправдано, в том числе экономически. Ретентат молочной сыворотки является продуктом ультрафильтрации кислой сыворотки с последующим обратным осмосом ультрафильтрационного пермеата. Этот наиболее богатый питательными веществами вариант молочной сыворотки содержит лактозу как источник органического углерода и азот, потребляемые для роста микроорганизмами [19].

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 нее [2, 11]. При этом обогащение молочной сывороткой в объеме 1–3 % не изменяет значения рН среды [2].

Нами было выдвинуто предположение, что добавление молочной сыворотки к питательной среде для выращивания цианобактерий родов *Spirulina* и *Arthrospira* может повысить эффективность их рекультивирования после криоконсервации. Ранее данное предположение не было проверено. Также в настоящей работе проведена оценка влияния ретентата молочной сыворотки при обогащении им разбавленной питательной среды Заррука на содержание белков, липидов, сахаров и фенольных соединений у рекультивированных после криоконсервирования культур цианобактерий *A. platensis* и *S. subsalsa*.

## Материал и методы

В работе использовали аксеничные штаммы *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 из коллекции культур Института Пастера, Франция (The Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC), Paris). Выращивание исходных культур и низкотемпературное консервирование осуществляли согласно методике, описанной нами ранее [1].

Оценку эффективности низкотемпературного хранения цианобактерий осуществляли путем сравнительного определения количества жизнеспособных агломератов до и после хранения при -80 °С. Восстановленные культуры цианобактерий анализировали по величине биомассы в начале и конце ростового цикла.

Была определена возможность использования разбавленной питательной среды Заррука для рекультивирования цианобактерий после криоконсервирования. Для этого стандартную питательную среду Заррука разбавили равным объемом культуральной среды, оставшейся после выращивания на ней биомассы цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 и использованной для криоконсервирования.

Разбавленную среду Заррука обогатили ретентатом молочной сыворотки (рН 4,80, плотность 1,080 г/см<sup>3</sup>) до конечной концентрации 2 %. Использовали оригинальный ретентат и модифицированный (табл. 1). Ретентат (концентрат) был получен от фирмы

Sachsenmilch AG в жидком виде, состав определен сотрудниками кафедры Bioprocess Engineering Технического университета Дрездена. В исходном виде был использован для выращивания *Kluyveromyces marxianus* и в представленном исследовании – для цианобактерий как добавка к среде.

Таблица 1

Состав (мг/л) ретентата молочной сыворотки

Ингредиенты	Ретентат		Метод определения
	оригинальный	модифицированный	
Азот аммонийный	290	4610	Тест-набор Dr. Lange LCK303
Фосфор ортофосфатный	2150	2130	Тест-набор Dr. Lange LCK049
K	5320	6180	Атомно-эмиссионный спектрометр (ICP-AES, фирма Spectro Inc.)
Na	5100	5800	
S	147	4400	
Ca	2330	2640	
Mg	380	414	
Zn	11,7	38,0	
Fe	<0,4	21,7	
Cu	<0,8	5,5	
Mn	<0,4	5,3	

В биомассе цианобактерий, культивируемых после криоконсервации, определяли содержание редуцирующих (восстанавливающих) сахаров (методом Миллера [14]), суммарное количество липидов (методом, основанным на реакции с сульфосфосванилиновым реактивом [12, 20]) и суммарное количество белка (методом Бредфорда [5]). Общее содержание (сумму) фенольных соединений в экстракте цианобактерий установили стандартным методом с применением реактива Фолина–Чокальтеу, как описано в работах Синглтона и соавторов [17, 18].

Цианобактерии выращивали в автоклавированных конических стеклянных колбах Эрленмейера с широким горлышком объемом 100 мл с пробками из целлюлозной массы. Питательную среду стерилизовали фильтрованием через стерильный фильтр из ацетата целлюлозы (диаметр пор 0,45 мкм) и в количестве 15 мл добавляли в колбы Эрленмейера. Рост цианобактерий в колбах происходил при температуре 30 °C с 16-часовым фотоциклом в инкубаторе Minitron (фирма Infors HT) с постоянным перемешиванием с помощью встроенного орбитального шейкера диаметром качания 25 мм. Частота вращения 110 об/мин. Освещали шестью люминесцентными лампами GroLux 15W (фирма Osram Sylvania), которые располагались над колбами на высоте 40 см, обеспечивая среднюю интенсивность света на поверхности клеточной суспензии 21 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup>с).

## Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что использование разбавленной (1 : 1) среды Заррука позволяет сохранить жизнеспособность и возможность роста штаммов цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервирования (табл. 2).

Таблица 2

Прирост биомассы (г/л) цианобактерий после криоконсервации

Питательная среда Заррука	<i>Spirulina subsalsa</i> PCC 9445	<i>Arthrospira platensis</i> PCC 9223
Разбавленная	0,633 ± 0,008	0,903 ± 0,001
Стандартная	0,677 ± 0,002	1,154 ± 0,002

Так, у исследуемых штаммов цианобактерий *A. platensis* и *S. subsalsa* после оттаивания наблюдали рост трихом на разбавленной среде Заррука, а прирост биомассы составил соответственно 78,25 и 93,5 % от показателей на стандартной питательной среде Заррука, если принять последние за 100 %.

#### **Прирост биомассы цианобактерий, выращиваемых после криоконсервации на разбавленной питательной среде Заррука, обогащенной ретенатом молочной сыворотки**

Несмотря на эффективность применения разбавленной среды Заррука, в экспериментах наблюдается замедленный прирост биомассы цианобактерий после криоконсервации по сравнению с контролем (табл. 2). Поэтому необходимо было исследовать возможность оптимизации состава разбавленной среды Заррука путем внесения дополнительных соединений.

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

Чтобы оценить влияние молочной сыворотки на эффективность рекультивирования криоконсервированных культур *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445, их сразу после оттаивания выращивали на двух вариантах питательной среды, обогащенных оригинальным либо модифицированным ретенатом молочной сыворотки (табл. 1).

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 % в случае оригинального ретената до 25,5 % – модифицированного) и *S. subsalsa* PCC 9445 (соответственно от 5,2 до 28,7 %) после криоконсервации по сравнению с выращиванием без добавления ретената, т.е. с контрольной культурой.

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, отличающегося повышенным содержанием азота и большим содержанием ионов биологически значимых металлов (Zn, Fe, Cu, Mn).

Такое предположение подтверждается исследованиями, что цианобактерии, например рода *Arthrospira*, способны усваивать питательные соединения молочной сыворотки [6]. Ранее было показано, что цианобактерии растут на среде из сточных вод завода по переработке молока (при разбавлении до 30 % с добавлением  $\text{NaHCO}_3$  до 16 г/л) [7]. Также было показано, что при выращивании цианобактерий на подсырной сыворотке их биомасса увеличивалась на 40–97 % [6].

В наиболее близкой по тематике (применение молочной сыворотки для обогащения питательной среды) к нашему исследованию работе [19] цианобактерию *A. platensis* выращивали на разбавленной дистиллированной водой среде Заррука (20 и 30%-й) с добавлением ретената молочной сыворотки в концентрациях 1,25 и 2,5 %. В статье показано, что замена стандартной среды Заррука на разбавленную (20%- и 30%-ю) с добавлением ретената молочной сыворотки не оказывает влияния на рост цианобактерии. Авторы отмечают, что достигли идентичной конечной концентрации клеток на стандартной среде Заррука и на разбавленной с добавлением 2,5 % ретената молочной сыворотки. Такие данные можно объяснить тем, что, в отличие от используемых в настоящей работе ретенатов (оригинального и модифицированного), ретенат в работе [19] имел высокое содержание лактозы (7,18 %), но меньшее – магния (118,20 мг/л) и общего аммонийного азота (107,10 мг/л).

### Эффективность биосинтеза цианобактерий, выращиваемых после криоконсервации на разбавленной питательной среде Заррука, обогащенной ретентатом молочной сыворотки

*Сахара, белки и липиды.* Обогащение питательной среды Заррука ретентатом молочной сыворотки способствует увеличению содержания белка, редуцирующих сахаров и липидов в биомассе выращенных на ней культур *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 (рис. 1, 2), рекультивированных после криоконсервации. Это может быть связано с повышением эффективности фотосинтеза цианобактерий, обусловленным богатым содержанием магния в ретентате.

Результаты исследования также показали различия между исследуемыми видами цианобактерий. Так, цианобактерия *S. subsalsa* PCC 9445 была более чувствительна к применению среды, обогащенной ретентатом молочной сыворотки после криоконсервирования (рис. 1, 2), что привело к увеличению эффективности синтеза. Это может быть связано с отзывчивостью штамма, его особенностями, в том числе видовыми.

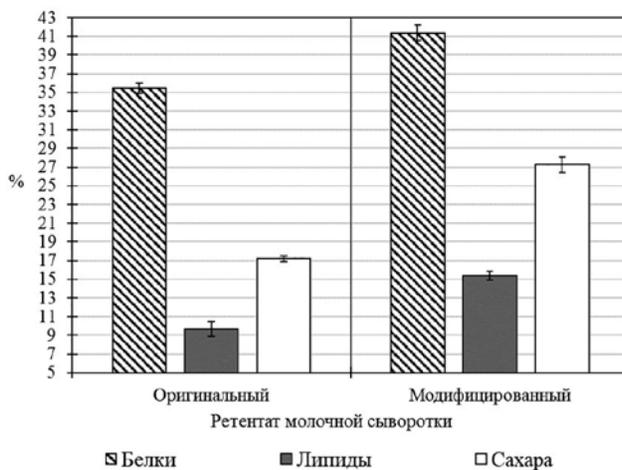


Рис. 1. Увеличение (%) содержания белка, редуцирующих сахаров и липидов в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445, выращенной после криоконсервации в присутствии ретентата молочной сыворотки, по сравнению с культивированной без ретентата

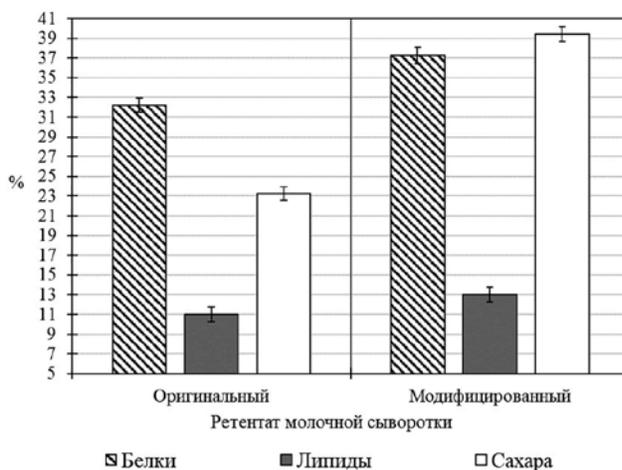


Рис. 2. Увеличение (%) содержания белка, редуцирующих сахаров и липидов в биомассе *A. platensis* PCC 9223, выращенной после криоконсервации в присутствии ретентата молочной сыворотки, по сравнению с культивированной без ретентата

Таким образом, обогащение разбавленной питательной среды Заррука модифицированным ретентатом молочной сыворотки позволило увеличить в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 содержание общего белка и редуцирующих сахаров на 14,67 и 4,69 % соответственно по сравнению с вариантом опыта, где применялся оригинальный ретентат (рис. 1). В биомассе *A. platensis* PCC 9223 увеличение составило 11,99 и 9,16 % соответственно (рис. 2).

В аналогичном исследовании Chang et al. [7] было показано, что в сухой биомассе исследуемой цианобактерии, выращенной на разбавленной до 30 % сточной воде завода по переработке молока, содержится 65,2 % белка, 11,3 % сахаров и 7,0 % липидов, в то время как при росте на минеральной среде было 72,5 % белка, 8,3 % сахаров и 6,3 % липидов.

В то же время в статье Vieira Salla et al. [19] 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 белка (на 26,44 %) и увеличение – сахаров (на 17,24 %). Авторы связывают полученные результаты с присутствием в ретентате лактозы, которая, сама являясь сахаром, может повлиять на количество сахаров и липидов в биомассе цианобактерии, а также разбавлением питательной среды Заррука, что привело к ограничению азота и перенаправлению фотоассимилированного углерода на синтез углеводов вместо белков и пигментов [19].

Более высокое содержание белка и пигментов в биомассе цианобактерий фиксируется в условиях достаточного количества азота в питательной среде. Сохранить высокое содержание белка в биомассе цианобактерий после криоконсервирования представлялось крайне важным, поскольку целью является производство биомассы цианобактерий с высоким содержанием продуктов синтеза, т.е. с высокими питательными характеристиками.

В нашем исследовании сохранение высокого содержания белка в биомассе рекультивированных цианобактерий свидетельствует о достаточном содержании азота в исследуемых питательных средах, что достигалось благодаря применению модифицированного ретентанта молочной сыворотки.

*Фенольные соединения* являются антиоксидантами, их присутствие увеличивает ценность цианобактерий *A. platensis* и *S. subsalsa* как пищевой добавки и способствует увеличению срока хранения их биомассы как продукта. Добавление к разбавленной питательной среде Заррука ретентата молочной сыворотки привело к повышению выработки фенольных соединений в биомассе *S. subsalsa* в 1,4–1,8 раз, *A. platensis* – в 1,8–2,4 раза (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние добавки ретентата молочной сыворотки к среде Заррука на содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий (мг/г)**

Ретентат молочной сыворотки	<i>Spirulina subsalsa</i> PCC 9445	<i>Arthrospira platensis</i> PCC 9223
Оригинальный	3,11 ± 0,22	2,41 ± 0,25
Модифицированный	3,93 ± 0,20	3,28 ± 0,27
Контроль (разбавленная среда Заррука без ретентата)	2,17 ± 0,23	1,34 ± 0,15

Содержание фенольных соединений в биомассе изучаемых цианобактерий при использовании среды с модифицированным ретентатом молочной сыворотки оказалось существенно выше, чем в случае с оригинальным ретентатом, – на 26,36 % для *S. subsalsa* PCC 9445 и 36 % для *A. platensis* PCC 9223. Вероятно, сказалась разница в количестве азота, необходимого для синтеза аминокислот, в том числе ароматических, играющих важную роль в биосинтезе фенольных соединений. Полученные данные подтверждают работы, в которых показано положительное влияние повышенной концентрации азота в питательной

среде на содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий рода *Arthrospira* [4, 8, 9].

### Заключение

Данное исследование показало возможность применения разбавленной (1 : 1) среды Заррука для рекультивирования цианобактерий *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 после криоконсервации и подтвердило эффективность применения ретентата молочной сыворотки для обогащения среды Заррука. Выращивание цианобактерий после криоконсервации на разбавленной среде Заррука с добавлением ретентата молочной сыворотки способствовало увеличению содержания в их биомассе таких важных соединений, как редуцирующие сахара, липиды, белки, а также фенольные соединения. При этом наибольший результат достигался в случае использования модифицированного ретентата, что можно объяснить повышенным содержанием в нем азота (до 4610 мг/л) и биологически значимых элементов, таких как Zn, Fe, Cu, Mn.

Возможно, что выращивание цианобактерий на питательной среде с молочной сывороткой сразу после оттаивания оказывает антистрессовый эффект и способствует восстановлению их клеток.

Следует также отметить значительную экономическую выгоду от использования разбавленной в 2 раза питательной среды Заррука с добавлением молочной сыворотки – недорогого побочного продукта молочной промышленности. Это снижает стоимость процесса, оставляя высокой эффективность рекультивирования цианобактерий после криоконсервации и синтеза ими белков, сахаров, липидов и фенольных соединений, а использование культуральной среды после выращивания цианобактерий уменьшает количество отходов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Петрухина Д.И., Лыков И.Н. Исследование эффективности сохранения цианобактерии *Spirulina subsalsa* после криоконсервации при -80 °С в присутствии глюкозы // Изв. вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. Т. 6, № 4. С. 68–73.
2. Хоменко А.Д. Биотехнологія культивування *Spirulina platensis* за використання сироватки молока та застосування біомаси водорості у перепелівництві: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. Білацерква, 2015. 20 с.
3. Храмов А.Г. Биотехнологические основы получения и применения природных БАВ на основе универсального сельскохозяйственного сырья животного происхождения – молочной сыворотки // Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ (Нарочанские чтения-11). Минск; Ставрополь, 2017. С. 162–165.
4. 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 // African J. Biotechnology. 2009. Vol. 8, iss. 24. P. 7059–7067.
5. 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, iss. 1/2. P. 248–254.
6. 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* // Materials of the XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancún, México, 2013. VC-16.
7. Chang W.T., Lee M., Den W. Simultaneous carbon capture, biomass production, and dairy wastewater purification by *Spirulina maxima* photobioreaction // Industrial and Engineering Chemistry Research. 2013. Vol. 52, iss. 5. P. 2046–2055.
8. Colla L.M., Furlong E.B., Vieira Costa J.A. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2007. Vol. 50, iss. 1. P. 161–167.
9. 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 Technology. 2007. Vol. 98. P. 1489–1493.
10. Golmakani M.-T., Rezaei K., Mazidi S., Razavi S.H. Effect of alternative C<sub>2</sub> carbon sources on the growth, lipid, and  $\gamma$ -linolenic acid production of spirulina (*Arthrospira platensis*) // Food Science and Biotechnology. 2012. Vol. 21, iss. 2. P. 355–363.

11. 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. Biological Sci. 2014. Vol. 3, iss. 1. P. 22–30.
12. Knight J.A., Anderson S., Rawle J.M. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids // Clin. Chem. 1972. Vol. 18, iss. 3. P. 199–202.
13. Loftus S.E., Johnson Z.I. Cross-study analysis of factors affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production // Algal Research. 2017. Vol. 24, pt A. P. 154–166.
14. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. 1959. Vol. 31. P. 426–428.
15. Morocho-Jácome A.L., Mascio 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 Research. 2016. Vol. 13. P. 159–166.
16. 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. Biotechnol. 2016. Vol. 91. P. 901–910.
17. 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. 1999. Vol. 299. P. 152–178.
18. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // Am. J. Enol. Vitic. 1965. Vol. 16. P. 144–158.
19. 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 Technology. 2016. Vol. 209. P. 133–141.
20. 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, iss. 6. P. 545–561.