

ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER.

© 2022

Зайцев В.В., Петряков В.В., Зайцева Л.М., Махимова Ж.Н.

Самарский государственный аграрный университет (г. Самара, Российская Федерация)

Аннотация. В данной статье рассматриваются морфологические особенности и характер жизнеспособности клеточных групп микроводоросли *Chlorella vulgaris* Beijer., произрастающей в искусственной питательной среде. Было установлено, что в морфологическом аспекте микроводоросль имеет одноклеточную структуру клеток округлой или эллипсоидальной форм с диаметром клеточных структур от 2 до 10 мкм. Структура клетки хлореллы представлена в виде тонкой оболочки, в цитоплазме которой погружено ядро с оформленным хлоропластом. Оптимальными параметрами для интенсивного роста микроводоросли хлореллы явились температурные значения в пределах +27...+29°C. В таких температурных значениях микроводоросль хлореллы показала наилучшие результаты по скорости роста клеток и в значениях показателя её жизнеспособности. При этом культура клеток хлореллы, имея возможности в опережающем росте клеток, способна длительное время сохранять свою систематическую разновидность. Кроме того, было выявлено, что у клеток хлореллы ярко выражен фототропизм, выражающийся в ответных реакциях на световой импульс и способность целенаправленно двигаться по направлению к нему в форме фототаксиса. Дальнейшие наблюдения показали, что большинство клеток хлореллы в видимом поле микротетрии имели размеры порядка 4–6 мкм со средним их количественным содержанием порядка 4,5 млн клеточных структур микроводоросли в одном миллилитре питательной (культуральной) среды. Показатель оптической плотности изучаемой культуры клеток хлореллы через 14 суток роста в питательной среде увеличился к концу наблюдений чуть более чем в 2 раза, что свидетельствует о достаточно высоком значении жизнеспособности клеточных структур культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris* Beijer.

Ключевые слова: хлорелла; микроводоросль; жизнеспособность; морфология клеток; структура; строение; фототаксис; питательная среда.

THE INFLUENCE OF THE NUTRIENT MEDIUM ON THE MORPHOLOGICAL FEATURES AND CELL VIABILITY OF THE MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER.

© 2022

Zaitsev V.V., Petryakov V.V., Zaitseva L.M., Makhimova Zh.N.

Samara State Agrarian University (Samara, Russian Federation)

Abstract. This paper discusses morphological features and the nature of the viability of the cell groups of the microalgae *Chlorella vulgaris* Beijer., growing in an artificial nutrient medium. It has been found that in the morphological aspect, the microalgae have a unicellular cell structure of rounded or ellipsoidal shapes with a diameter of cell structures from 2 to 10 microns. The structure of the chlorella cell is represented as a thin shell, in the cytoplasm of which the nucleus with a decorated chloroplast is immersed. The optimal parameters for the intensive growth of chlorella microalgae were temperature values in the range of +27...+29°C. In such temperature values, chlorella microalgae showed the best results in terms of cell growth rate and in the values of its viability index. At the same time, the culture of chlorella cells, having the ability to outstrip cell growth, is able to maintain its systematic variety for a long time. In addition, it has been found that chlorella cells have a pronounced phototropism, expressed in responses to a light pulse and the ability to purposefully move towards it in the form of phototaxis. Further observations showed that the majority of chlorella cells in the visible field of micrometry were about 4–6 microns in size with an average quantitative content of about 4.5 million microalgae cell structures in one milliliter of nutrient (culture) medium. The indicator of the optical density of the studied chlorella cell culture after 14 days of growth in the nutrient medium increased by the end of observations by a little more than 2 times, which indicates a sufficiently high value of the viability of the cell structures of the *Chlorella vulgaris* Beijer. microalgae culture.

Keywords: chlorella; microalgae; viability; cell morphology; structure; phototaxis; nutrient medium.

Введение

Одной из основных мировых проблем является обеспечение населения планеты достаточным количеством продовольствия. Поскольку прогнозируется, что к 2050 году население мира увеличится еще на 2 млрд человек, текущие оценки показывают, что для удовлетворения такого спроса недостаточно воды и пахотных земель [1, с. 79]. В связи с этим поиск альтернативных высококачественных белковых добавок в пищу человека и кормах для животных, заменяющих традиционные источники белка, в настоящее время является важной задачей как для науки, так и для практики.

Одноклеточную зеленую микроводоросль *Chlorella vulgaris*, известную относительной простотой выращивания и высокой продуктивностью [2, р. 1674], стали включать в корма в качестве источника белка и других ценных компонентов, таких как незаменимые аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, витамины и натуральные пигменты [3, р. 13; 4 р. 116; 5 р. 1591]. Пищевая хлорелла может частично заменить сою в кормах для птицы из-за высокого содержания белка (приблизительно 50%) и сбалансированного профиля аминокислот [6, р. 119]. Помимо химического состава, усвояемость также является важным параметром, который следует учиты-

вать при оценке питательного качества новых кормовых ингредиентов.

В настоящее время зеленую микроводоросль *Chlorella* выращивают в больших масштабах для различных целей, включая корма для животных, богатые белком [7; 8, p. 286–289], поскольку есть признаки того, что водоросли могут выращивать на различных типах сточных вод или ила [9, p. 1238–1244; 10, p. 431]. Некоторые исследования показали благотворное влияние этих продуктов на здоровье кишечника домашних животных [11, p. 103–104], и хлорелла уже используется в качестве источника белка в питании человека [12, p. 164–166; 13, p. 963]. Критически важные для здоровья вегетарианцев микроводоросли являются источником витамина В₁₂. Хотя некоторые зеленые водоросли кажутся автотрофными по кобаламину, часто истинным источником этого витамина являются ассоциированные бактерии [14, p. 66]. Различные микроводоросли, включая виды *Chlorella*, являются источниками каротиноидов [15, p. 545; 16] и ненасыщенных жирных кислот; оба пользуются большим спросом в рыбоводстве [17].

Цель исследования заключалась в изучении влияния питательной среды на морфологию и жизнеспособность клеток культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris* Beijer.

Объектом исследований выступала одноклеточная зеленая микроводоросль *Chlorella vulgaris* Beijer.

Материалы и методика исследований

В данной работе была изучена хлорелла обыкновенная штамма *Chlorella vulgaris* Beijer. var. *vulgaris* IPPAS C-1, произведенная в ООО «Х-БИО». Для произрастания микроводоросли хлореллы выступала исходная культура клеток, которая содержалась в жидкой питательной среде ½ Тамия [18, с. 13–18]. Данная питательная среда применяется для выращивания синие-зеленых водорослей в различных разведениях при температурном диапазоне в пределах +27...+29°C и постоянном искусственном освещении 25–30 мкмоль квантов света на м² в сек. [19, с. 29].

Рассматривая морфологию и жизнеспособность клеток культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris* Beijer., особое внимание было направлено на ответные фотореакции, строение клеточной структуры подвижных клеток микроводоросли с применением микроскопии при разном увеличении (×8, ×15, ×40) [20, с. 15–18].

Подсчет количества клеток хлореллы в культуральной среде осуществлялось методом микроскопирования, с использованием камеры Горяева, лабораторной посуды и приспособлений. Производился визуальный подсчет численности клеток изучаемой микроводоросли в исследуемой пробе в камере Горяева при микроскопировании (при увеличении ×40...×100). Единицей подсчета считалась одна клетка. В зависимости от плотности клеток подсчет производился либо по всему полю камеры (при малой численности), в 25 больших квадратах (при средней численности), либо по диагонали в 16 больших квадратах (при высокой численности клеток) с применением следующей формулы:

$$N = (1000 \times n) / (S \times h),$$

где N – количество клеток в 1 мл; 1000 – коэффициент пересчета мм³ в см³; n – количество просчитанных клеток в определенном секторе камеры Горяева; h – глубина счетной камеры 0,1 мм; S – площадь сектора (при площади «большого» квадрата 0,04 мм²).

Размер изучаемых клеток микроводоросли проводили с помощью микрометрии с использованием окулярмикрометра и шкалы объектомикрометра.

Определение характера жизнеспособности клеток изучаемой культуры микроводоросли хлореллы осуществлялось согласно разделу 4.7 СОП по характеру периодического пересева штаммов фонда коллекции IPPAS ИФР РАН [18, с. 24]. Рассматриваемую колонию клеток хлореллы пересевали в питательную среду и по окончании исследований на 14 сутки полученную в процессе роста пересеянную культуру клеток микроводоросли апробировали на уровень её жизнеспособности, то есть способности клеток хлореллы проявлять характер роста в пересеянном материале, путем изменения оптической плотности среды при значении 750 нм. Данная методика показывает различия в величине оптической плотности исследуемой культуры водоросли хлореллы при посадке в питательную среду при постановке опыта (в первые сутки) и в конце опыта (на 14 сутки) в результате роста её биомассы с помощью фотоэлектроколориметра.

Результаты исследований и их обсуждение

Одноклеточная зеленая микроводоросль *Chlorella vulgaris* Beijer. относится к отряду Chlorophyta, классу Euklorophyceae, порядку Chlorococcales, семейству Chlorellaceae, подсемейству Chlorelloideae, роду *Chlorella* Beijer., виду *Chlorella vulgaris* Beijer. [21, с. 235–236].

Культура микроводоросли легко микроскопируется. Результаты наблюдений показали, что по морфологическим показателям клетки хлореллы представляет собой одноклеточную ядерную структуру с округлой или реже эллипсоидальную формами. Определяемые размеры клеточных структур показали, что клетки микроводоросли хлореллы имеют разную величину, составляющую в диаметре от 2 до 10 мкм. Структура клетки хлореллы представлена в виде тонкой гладкой целлюлозной оболочки, в цитоплазме которой погружено ядро с оформленным хлоропластом.

На рисунке 1 представлены результаты микроскопирования колоний живых клеток микроводоросли хлореллы при разных увеличениях.

Процессы культивирования хлореллы показали, что клетки микроводоросли размножаются бесполом путем за счет быстро развивающихся автоспор, образующихся в результате деления содержимого материнской клетки. Результаты наблюдений показали, что количество данных автоспор за 12 часов достигает 8 единиц. Было выявлено, что деление клеток хлореллы происходило, как правило, один раз в сутки, однако в условиях культивируемой питательной среды она была способна к более активному размножению (4–8 делений в сутки). Такой интенсивный клеточный рост обеспечивается за счет её термофильного штамма с оптимальными температурными значениями в пределах +27...+29°C [22, с. 72–73]. Наблюдения показали, что в таких параметрах регулярно пересеваемая культура микроводоросли с учетом её опережающего роста клеток на протяжении длительного времени способна содержать в своей культуре только одну систематическую форму без применения специальных приемов её очистки и стерилизации.

Дальнейшие наблюдения за изучаемой культурой показали, что клетки хлореллы способны к фотодвижению, то есть активно реагировать в ответ на действие светового стимула. Так было установлено, что у микроводоросли хлореллы проявляется светоиндуцированная активность подвижности её клеток в результате положительного фотокинеза в форме фототаксиса – движения клеток микроводоросли по направлению к освещению падающего света.

В сравнительном аспекте важным признаком выступают размеры клеточной структуры. При проведении микрометрии клеток хлореллы определялся их размер. Наблюдения показали, что большинство клеток хлореллы в видимом поле микрометрии имели размеры порядка 4–6 мкм. Подсчет количества клеток в суспензии микроводоросли показал, что в одном миллилитре культуральной среды содержится порядка 4,5 млн клеточных структур микроводоросли.

Определение концентрации микроорганизмов в питательной среде и последующий контроль состояния роста биомассы культуры штамма проводился фотокалориметрическим методом. Для этого изучаемый штамм *Chlorella vulgaris* Beijer. пересевали в питательную среду 1/2 Тамия и помещали в указанные условия роста и благоприятно способствовавшие росту биомассы микроводоросли. Проводилась оценка по изменению оптической плотности суспензии хлореллы при 750 нм при посадке в искусственную питательную среду. На рисунке 2 представлен график изменения оптической плотности культуры в процессе роста биомассы исследуемой культуры.

Результаты исследований по изучению биомассы культуры микроводоросли хлореллы показали, что определяемая оптическая плотность исследуемой культуры по окончании наблюдений на 14 сутки по сравнению с началом опыта увеличилась чуть более чем в 2 раза, что доказывает высокую жизнеспособность культуры. Это согласуется с рядом авторов [23, р. 343–344], когда при культивировании микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa* также наблюдалась наивысшая плотность клеток на 8-е сутки выращивания.

Кроме того, была отмечена способность хлореллы быстро поглощать и усваивать углекислый газ и питательные вещества (например, азот и фосфор) из потоков отходов (например, дымовых газов и сточных вод) и синтезировать большое количество липидов, белков и др., что имеет большое практическое значение [24, р. 327]. А также было установлено, что фосфор оказывает гормезисное действие на микроводоросли. Незначительный его избыток в условиях ограничения азота стимулировал рост клеток *Chlorella regularis* и обеспечивал увеличение продукции биомассы на 10,2%, а также улучшал митохондриальную активность на 25,0% [25].

Таким образом, микроводоросль хлорелла представляет собой одноклеточный биореактор, приводимый в действие солнечным светом, который превращает углекислый газ в потенциальные белки, липиды, углеводы и ценные биологические соединения в присутствии достаточного количества азота, фосфора и некоторых микроэлементов [26, с. 295–299].

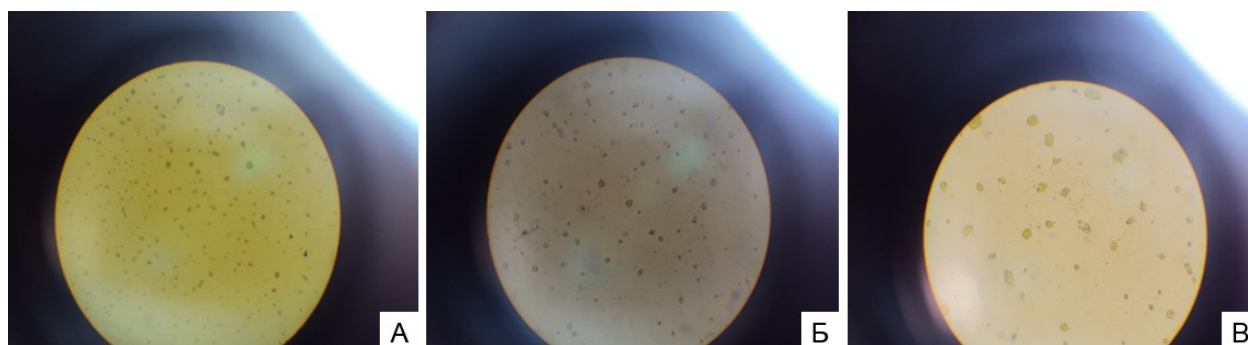


Рисунок 1 – Колония клеток при увеличении 8 × 10 (А), 8 × 15 (Б), 8 × 40 (В)

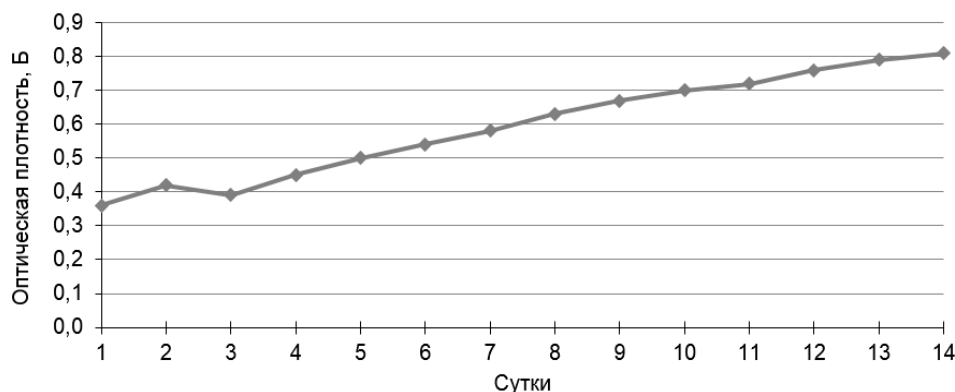


Рисунок 2 – Оптическая плотность биомассы при 750 нм исследуемой культуры *Chlorella vulgaris* Beijer. при посадке в искусственную питательную среду на первые сутки и по завершении опыта по её произрастанию (через 14 суток)

Выводы

1. Было выявлено, что деление клеток хлореллы происходило, как правило, один раз в сутки, однако в условиях культивируемой питательной среды она была способна к более активному размножению (4–8 делений в сутки). Такой интенсивный клеточный рост обеспечивается за счет её термофильного штамма с оптимальными температурными значениями в пределах +27...+29°C.

2. Клеточная структура микроводоросли хлореллы способна к фотодвижению, в результате положительного фотокинеза в форме фототаксиса – движения клеток микроводоросли по направлению к освещению падающего света.

3. Подсчет количества клеток в суспензии микроводоросли показал, что в одном миллилитре культуральной среды содержится порядка 4,5 млн клеточных структур микроводоросли.

4. Значение уровня оптической плотности по окончании наблюдений за исследуемой культурой на 14-е сутки увеличилось более чем в 2 раза, что свидетельствует о высокой жизнеспособности культуры.

Список литературы:

1. Сложенкина М.И., Федотова А.М., Мосолова Е.А. Глобальные проблемы сохранения биоразнообразия и продовольственной безопасности // Аграрно-пищевые инновации. 2020. № 4 (12). С. 76–86. DOI: 10.31208/2618-7353-2020-12-76-86.
2. Buono S., Langellotti A.L., Martello A., Rinna F., Fogliano V. Functional ingredients from microalgae // Food & Function. 2014. Vol. 5, iss. 8. P. 1669–1685. DOI: 10.1039/c4fo00125g.
3. Andrade L.M., de Andrade C.J., Dias M., Nascimento C.A., Mendes M. *Chlorella* and *Spirulina* microalgae as sources of functional foods, nutraceuticals, and food supplements; an overview // MOJ Food Processing Technology. 2018. Vol. 6. P. 1–14. DOI: 10.15406/mojfpt.2018.06.00144.
4. Madeira M.S., Cardoso C., Lopes P.A., Coelho D., Afonso C., Bandarra N.M., Prates J.A.M. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: a review // Livestock Science. 2017. Vol. 205. P. 111–121. DOI: 10.1016/j.livsci.2017.09.020.
5. Shen X.-F., Qin Q.-W., Yan S.-K., Huang J.-L., Liu K., Zhou S.-B. Biodiesel production from *Chlorella vulgaris* under nitrogen starvation in autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic cultures // Journal of Applied Phycology. 2019. Vol. 31. P. 1589–1596. DOI: 10.1007/s10811-019-01765-1.
6. Lamminen T., Jaakkola S., Vanhatalo A. Different microalgae species as a substitutive protein feed for soya bean meal in grass silage based dairy cow diets // Animal Feed Science and Technology. 2019. Vol. 247. P. 112–126. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2018.11.005.
7. Bleakley S., Hayes M. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production // Foods. 2017. Vol. 6 (5). DOI: 10.3390/foods6050033.
8. Grossmann L., Hinrichs J., Weiss J. Solubility and aggregation behavior of protein fractions from the heterotrophically cultivated microalga *Chlorella protothecoides* // Food Research International. 2019. Vol. 116. P. 283–290. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.037.
9. Markou G., Wang L., Ye J., Unc A. Using agro-industrial wastes for the cultivation of microalgae and duckweeds: contamination risks and biomass safety concerns // Biotechnology Advances. 2018. Vol. 36, iss. 4. P. 1238–1254. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.003.

10. Eladel H., Abomohra A.E., Battah M., Mohamed S., Radwan A., Abdelrahman H. Evaluation of *Chlorella sorokiniana* isolated from local municipal wastewater for dual application in nutrient removal and biodiesel production // Bioprocess and Biosystems Engineering. 2019. Vol. 42. P. 425–433. DOI: 10.1007/s00449-018-2046-5.

11. Kang H.K., Salim H.M., Akter N. et al. Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens // Journal of Applied Poultry Research. 2013. Vol. 22, iss. 1. P. 100–108. DOI: 10.3382/japr.2012-00622.

12. Panahi Y., Darvishi B., Jowzi N., Beiraghdar F., Sahebkar A. *Chlorella vulgaris*: a multifunctional dietary supplement with diverse medicinal properties // Current Pharmaceutical Design. 2016. Vol. 22, iss. 2. P. 164–173. DOI: 10.2174/138161282266615112145226.

13. Wells M.L., Potin P., Craigie J.S. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding // Journal of Applied Phycology. 2017. Vol. 29. P. 949–982. DOI: 10.1007/s10811-016-0974-5.

14. Helliwell K.E. The roles of B vitamins in phytoplankton nutrition: new perspectives and prospects // New Phytologist. 2017. Vol. 216, iss. 1. P. 62–68. DOI: 10.1111/nph.14669.

15. Ambati R.R., Gogisetty D., Gokare R.A. et al. *Botryococcus* as an alternative source of carotenoids and its possible applications – an overview // Critical Reviews in Biotechnology. 2018. Vol. 38, iss. 4. P. 541–558. DOI: 10.1080/07388551.2017.1378997.

16. Sun X.-M., Ren L.-J., Zhao Q.-Y., Ji X.-J., Huang H. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation // Biotechnology for Biofuels. 2018. Vol. 11. DOI: 10.1186/s13068-018-1275-9.

17. Kiesenhofer D.P., Fluch S. The promises of microalgae – still a long way to go // FEMS Microbiology Letters. 2018. Vol. 365, iss. 1. DOI: 10.1093/femsle/fnx257.

18. Мессинева Е.М., Козлова А.Ю., Маркелова А.Г., Синетова М.А. Технологический паспорт коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS Института физиологии растений РАН. 2017. 85 с.

19. Харчук И.А. Оценка жизнеспособности трех видов микроводорослей после воздействия низких температур с криопротекторами // Вопросы современной альгологии. 2017. № 1 (13). С. 29.

20. Практическая экотоксикология: оценка чувствительности биотесткультур: учеб. пособие / сост. Е.В. Федосеева, Н.Ю. Сапункова, В.А. Терехова; под ред. В.А. Тереховой. М.: Геос, 2016. 54 с.

21. Раджабова А.С. Особенности развития микроводоросли хлореллы в зависимости от условий среды // Вклад молодых ученых в аграрную науку: мат-лы междунар. науч.-практ. конф., Кинель, 17 апреля 2019 года. Кинель: Самарская государственная сельскохозяйственная академия, 2019. С. 234–237.

22. Петряков В.В. Характер роста и развития микроводоросли спирулины, произрастающей в искусственной среде // Общество. Наука. Инновации: сб. ст. XIX всерос. науч.-практ. конф.: в 4-х томах, Киров, 1–26 апреля 2019 года. Киров: Вятский государственный университет, 2019. С. 71–74.

23. Liu L., Zhao Y., Jiang X., Wang X., Liang W. Lipid accumulation of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation using acetate and ammonium // Bioresource Technology. 2018. Vol. 262. P. 342–346. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.04.092.

24. Liu J., Hu Q. *Chlorella*: industrial production of cell mass and chemicals // Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. Second Edition. 2013. P. 327–338. DOI: 10.1002/9781118567166.ch16.
25. Fu L., Li Q., Yan G., Zhou D., Crittenden J.C. Hormesis effects of phosphorus on the viability of *Chlorella re-*
- gularis* cells under nitrogen limitation // Biotechnology for Biofuels. 2019. Vol. 12. DOI: 10.1186/s13068-019-1458-z.
26. Богданова А.А., Флёрова Е.А., Паюта А.А. Влияние условий культивирования на качественные и количественные показатели *Chlorella vulgaris* // Химия растительного сырья. 2019. № 4. С. 293–304.

| Информация об авторе(-ах): | Information about the author(-s): |
|--|--|
| <p>Зайцев Владимир Владимирович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биоэкологии и физиологии сельскохозяйственных животных; Самарский государственный аграрный университет (г. Самара, Российская Федерация). E-mail: zaycev_vv1964@mail.ru.</p> <p>Петряков Владислав Вячеславович, кандидат биологических наук, доцент кафедры биоэкологии и физиологии сельскохозяйственных животных; Самарский государственный аграрный университет (г. Самара, Российская Федерация). E-mail: petrvtlad.79@mail.ru.</p> <p>Зайцева Лилия Михайловна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры биоэкологии и физиологии сельскохозяйственных животных; Самарский государственный аграрный университет (г. Самара, Российская Федерация). E-mail: lilyazaytseva1975@mail.ru.</p> <p>Махимова Жанылсын Нурлановна, аспирант кафедры биоэкологии и физиологии сельскохозяйственных животных; Самарский государственный аграрный университет (г. Самара, Российская Федерация). E-mail: aslzhan-90@mail.ru.</p> | <p>Zaitsev Vladimir Vladimirovich, doctor of biological sciences, professor, head of Bioecology and Physiology of Farm Animals Department; Samara State Agrarian University (Samara, Russian Federation). E-mail: zaycev_vv1964@mail.ru.</p> <p>Petryakov Vladislav Vyacheslavovich, candidate of biological sciences, associate professor of Bioecology and Physiology of Farm Animals Department; Samara State Agrarian University (Samara, Russian Federation). E-mail: petrvtlad.79@mail.ru.</p> <p>Zaitseva Lilia Mikhailovna, candidate of agricultural sciences, associate professor of Bioecology and Physiology of Farm Animals Department; Samara State Agrarian University (Samara, Russian Federation). E-mail: lilyazaytseva1975@mail.ru.</p> <p>Makhimova Zhanylsyn Nurlanovna, postgraduate student of Bioecology and Physiology of Farm Animals Department; Samara State Agrarian University (Samara, Russian Federation). E-mail: aslzhan-90@mail.ru.</p> |

Для цитирования:

Зайцев В.В., Петряков В.В., Зайцева Л.М., Махимова Ж.Н. Влияние питательной среды на морфологические особенности и жизнеспособность клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. // Самарский научный вестник. 2022. Т. 11, № 2. С. 52–56. DOI: 10.55355/snv2022112107.