

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* И *PENICILLIUM CANESCENS*,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГОРОДСКИХ ПОЧВ

И.М.Котельникова, Н.Г.Куимова, Л.П.Шумилова

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,
675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1

РЕЗЮМЕ

Изучен состав жирных кислот мицелия микромицетов (*Penicillium canescens* Sopp., *Aspergillus fumigatus* Fresen.), выделенных из почв г. Благовещенска. Главными для мицелия обоих штаммов являются линолевая, олеиновая и пальмитиновая кислоты. У *Aspergillus fumigatus* преобладает линолевая кислота (41,1%), у *Penicillium canescens* содержание линолевой кислоты незначительно превышает содержание олеиновой (35,4 и 31,2%, соответственно). Суммарная доля ненасыщенных жирных кислот (олеиновой, линолевой, линоленовой и других) в мицелии *Aspergillus fumigatus* достигала 71,3%, в мицелии *Penicillium canescens* – 72%. Главными насыщенными жирными кислотами в биомассе грибов были пальмитиновая и стеариновая. Состав жирных кислот мицелия *Penicillium canescens* характеризовался большим разнообразием минорных и следовых кислот. Результаты исследований представляют интерес для определения адаптивной стратегии грибов в техногенных экосистемах, а также могут быть использованы в дальнейшем для идентификации микромицетов.

Ключевые слова: *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium canescens*, микромицеты, жирные кислоты.

SUMMARY

THE COMPOSITION OF FATTY ACIDS OF
ASPERGILLUS FUMIGATUS AND
PENICILLIUM CANESCENS ISOLATED
FROM CITY SOILS

I.M.Kotel'nikova, N.G.Kuimova, L.P.Shumilova

Institute of Geology and Nature Management of Far
Eastern Branch RAS, 1 Relochniy Lane,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

Fatty acids composition of *Penicillium canescens* Sopp. and *Aspergillus fumigatus* Fresen. isolated from the soils of Blagoveshchensk (the Amur region, Russian Far East) was studied. Linoleic, oleic and palmitic acids are the main fatty acids for both strains. Linoleic acid is the major one (41.1%) in *Aspergillus fumigatus* micelium, the content of linoleic and oleic acids is almost equal (35.4 and 31.2% respectively) in *Penicillium canescens*. The percentage of nonsaturated fatty acids (olein, linoleic, linolenic and others) in a mycelium of *Aspergillus fumigatus* reached 71.3%, in *Penicillium canescens* mycelium – 72%. Palmitic and stearic acids were the main ones among saturated fatty acids in the fungi biomass. *Penicillium canescens* possessed a big variety of minor and trace fatty acids. The results are of interest for the study of fungi adaptive strategy in

technogenic ecosystems, and can be used for micromycetes identification.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium canescens*, micromycetes, fatty acids.

Микроскопические грибы относятся к гетеротрофным микроорганизмам, которые утилизируют органические вещества как источник углерода. Их основная функция – деструкция органических веществ и участие в биогеохимическом круговороте элементов. Микромицеты способны колонизировать живые организмы, используя их органические соединения как источник питания. Установленным фактом является то, что у людей с различными формами иммунодефицита микроскопические грибы вызывают заболевания, как инфекционные, так и аллергические [2]. При легочных микозах, особенно при инвазивных аспергиллезах, смертность достигает 95% [2]. В качестве возбудителей аспергиллезов описаны до 250 видов грибов рода *Aspergillus*, однако около 90% всех системных аспергиллезов вызывает *A. fumigatus* [2].

Ранее при исследовании разнообразия и состава сообщества мицелиальных грибов в почвах г. Благовещенска обнаружено присутствие *A. fumigatus* [1]. Этот вид встречался только в почвах центральной части города с высоким уровнем загрязнения тяжелыми металлами и относился к группе редких видов по частоте встречаемости. Доминирующим видом среди почвенных мицелиальных грибов, как в городе, так и на фоновой территории, был *Penicillium canescens* [1].

A. fumigatus является сапротрофом, распространен в почве, колонизирует органические субстраты и играет важную роль в биогеохимических циклах углерода и азота. Его споры выделяются в воздух и с воздушными потоками попадают в организм человека через органы дыхания [15]. *A. fumigatus* обладает рядом физиологических свойств, благодаря которым его относят к группе наиболее патогенных видов микромицетов: маленький размер конидий, что позволяет спорам проникать в легочные альвеолы, термотолерантность, устойчивость к окислительному стрессу, высокая скорость роста и разнообразие потребляемых питательных субстратов [2]. На молекулярном уровне патогенность и вирулентность этого микромицета определяется синтезом целого ряда специфических белков и вторичных метаболитов, в числе которых более 10 видов токсинов разной химической природы и 23 аллергена [2].

В последнее время получены доказательства, что ключевую роль в регуляции физиологических свойств микромицетов обеспечивают psi-факторы. Они служат внеклеточными сигналами в регуляции биосинтеза микотоксинов, продукции конидий, координируют меха-

низм межклеточной коммуникации у грибов [6]. В химическом отношении psi-факторы являются оксипипинами, производными полиненасыщенных жирных кислот (ЖК), таких как олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая. Образование оксипипинов зависит от активности ряда ферментов, как окисляющих жирные кислоты (липоксигеназ и диоксигеназ), так и высвобождающих ЖК из мембранных фосфо- и глицеролипидов (липаз) [6]. Известно, что *A. fumigatus* секретирует оксипипины, производные олеиновой и линоленовой кислот [14].

При видовой идентификации микромицетов ЖК служат хемотаксономическими маркерами у разных групп микроорганизмов, в том числе микромицетов [5, 7, 9, 12]. В настоящее время очень широко применяется определение видового состава сообщества микромицетов почв по составу ЖК [13].

Состав ЖК мицелия *A. fumigatus* охарактеризован в ряде работ [3, 9, 12]. Установлено, что главной ЖК (до 50% и более) является линолевая кислота, доминируют также олеиновая (14,5-24%) и пальмитиновая (14,5-18%) кислоты. Однако следует подчеркнуть, что содержание стеариновой и линоленовой кислот, а также данные по составу минорных и следовых ЖК в мицелии *A. fumigatus* различаются у всех авторов [3, 9, 12]. Разнообразие данных о качественном и количественном содержании минорных и следовых ЖК может быть обусловлено тем, что изученные штаммы выделены из различных источников обитания.

Качественный и количественный состав ЖК мицелия *P. canescens* не изучен, несмотря на то, что в литературе присутствуют данные о составе ЖК мицелия 18 видов рода *Penicillium* [7]. Различия между изученными видами рода *Penicillium* проявляются в значительном варьировании содержания главных и качественном составе минорных ЖК [7].

Целью работы было изучение состава ЖК микромицетов *P. canescens* и *A. fumigatus*, выделенных из городских почв г. Благовещенска с высоким уровнем загрязнения тяжелыми металлами. Выполненные исследования имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

Материалы и методы исследования

Микромицеты и условия выращивания

Объектами исследований явились два вида почвенных микромицетов: *Penicillium canescens* Sopp, являющийся доминирующим видом в почвах г. Благовещенска, и *Aspergillus fumigatus* Fresen, относящийся к редким видам [1]. Выделение грибов выполнено методом серийных разведений. Идентификация выделенных штаммов выполнена по общепринятым определителям [8]. Названия видов приведены в соответствии с базой данных [10]. Биомассу микромицетов для выделения липидов получали культивированием на жидкой среде Чапека при температуре 25°C в течение 7 суток в условиях постоянного встряхивания.

Анализ жирных кислот

Экстракцию липидов из грибной биомассы проводили модифицированным методом [11]. Масса мице-

лия, взятая для выделения липидов, составляла: *P. canescens* – 4,80 г, *A. fumigatus* – 1,36 г. Биомассу отфильтровывали через капрон, промывали дистиллированной водой, фиксировали в 70° изопропанол и выдерживали 30 минут. После чего экстрагировали изопропанолом при 70°, затем смесью изопропанол:хлороформ (1:1). Экстракты объединяли, упаривали на ротаторном испарителе. Осадок экстрагировали смесью хлороформ:метанол (1:1), к которому добавляли 5% NaCl. После разделения смеси слой хлороформа упаривали и сушили, полученный осадок растворяли в хлороформ:метаноле (1:1), хранили при -20° С. Массу общих липидов определяли гравиметрически.

Общий липидный экстракт перерастворяли в бензоле, метилировали вначале 1% метилатом натрия, после чего хлористым ацетилом в присутствии метанола по J.P.Carreau, J.P.Dubacq [4]. Метилловые эфиры ЖК (МеЖК) очищали тонкослойной хроматографией в системе бензол:гексан (7:3). Зону МеЖК удаляли с пластинки, элюировали гексаном, концентрировали и анализировали на газовом хроматографе Agilent 6890 (США) с пламенно-ионизационным детектором. Для разделения МеЖК использовали капиллярную колонку Carbowax длиной 30 м, с внутренним диаметром 0,25 мм. Режим хроматографирования: газ-носитель – гелий, скорость потока – 2 мл/минуту, температура ввода проб – 150°C, начальная температура – 50°C, подъем температуры до 180° со скоростью 10°/минуту, 2 минуты изотермического режима, далее подъем температуры до 220° со скоростью 5°/минуту, 16 минут изотермического режима. Для разделения длинноцепочечных МеЖК использовали также колонку HP5 длиной 30 м, с внутренним диаметром 0,25 мм. Начальная температура 100°C, подъем температуры до 320°C со скоростью 10°/минуту, 8 минут изотермического режима. Для идентификации ЖК использовали стандартную смесь метиловых эфиров ЖК (Supelco 37 Component FAME Mix).

Результаты исследования и их обсуждение

Общее содержание липидов у микромицетов зависит от условий культивирования и возраста культуры, и может достигать 30% от массы сухого мицелия [5]. Содержание общих липидов в мицелии на 7-е сутки культивирования составило (% на сухой вес): у *P. canescens* – 9,32%, *A. fumigatus* – 9,16%. Близкие значения содержания общих липидов у представителей разных родов микромицетов можно объяснить тем, что условия культивирования и возраст культур были одинаковыми.

Состав и количественное содержание жирных кислот липидного экстракта мицелия *P. canescens* и *A. fumigatus* представлены в таблице.

В мицелии *A. fumigatus* главной ЖК общих липидов была ненасыщенная линолевая кислота 18:2 (табл.). Доминировали также олеиновая 18:1 и насыщенная пальмитиновая кислоты 16:0. Указанные ЖК в сумме составляли 83,1% (табл.). Суммарная доля ненасыщенных ЖК преобладала и достигала 71,28%. Главными насыщенными ЖК были пальмитиновая и стеариновая

(табл.). Содержание стеариновой кислоты у *A. fumigatus* по литературным данным значительно различалось и варьировало от следовых количеств до 6,38% [3, 9, 12]. Штамм, выделенный из почв г. Благовещенска, характеризовался более высоким уровнем стеариновой кислоты – 8,22% (табл.).

Таблица
Содержание жирных кислот в биомассе
почвенных грибов (%)

Жирные кислоты	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	<i>Penicillium canescens</i> Sopp.
Лауриновая 12:0	0,1	0,05
Миристиновая 14:0	0,2	0,2
Цис-9-тетрадеценвая 14:1	0,1	0,02
Пентадекановая 15:0	0,2	0,3
Пальмитиновая 16:0	18,5	18,1
Цис-9-гексадеценвая 16:1	-	0,9
Гептадекановая 17:0	0,3	0,6
Стеариновая 18:0	8,22	6,43
Олеиновая 18:1n-9	23,5	31,2
Линолевая 18:2n-6	41,1	35,4
Линоленовая 18:3n-3	5,0	3,0
Арахидиновая 20:0	-	0,5
Цис-11 эйкозеновая 20:1	1,5	1,1
Бегеновая 22:0	-	0,5
Неидентифицированная	-	1,1
Лигноцериновая 24:0	1,2	0,54
Нервоновая 24:1	0,08	0,06

Сведения по содержанию линоленовой кислоты 18:3 в липидах мицелия *A. fumigatus* противоречивы. Концентрация линоленовой кислоты у изученного нами штамма достигала 5% (табл.). Достаточно высокое содержание этой кислоты (до 17,5%) было установлено у *A. fumigatus*, выделенного из карстовой пещеры в Чехии [12]. По данным других авторов у штаммов, выделенных из воздуха, почвы, тканей человека линоленовая кислота встречалась в минорных и следовых количествах, не превышая 1,5% [3, 9].

В минорных количествах в липидах мицелия *A. fumigatus*, выделенного из почв г. Благовещенска, обнаружены цис-11-эйкозеновая и лигноцериновая кислоты (табл.). Следовые ЖК представлены как короткоцепочечными с 12-14 атомами углерода, так и кислотами с 16 и более атомами углерода (табл.). Наличие у *A. fumigatus* короткоцепочечных ЖК 12:0, ОН-12:0, 12:2 в качестве следовых обнаружили М. Birch и соавт. [3]. В работах [3, 9, 12] длинноцепочечные ЖК (цис-9-гекса-

деценвая, гептадекановая, гептадеценвая, арахидиновая, бегеновая, лигноцериновая и нервоновая) у *A. fumigatus* описаны как минорные и следовые. Только гептадекановая кислота (17:0) была минорной ЖК у большинства штаммов, изученных зарубежными авторами [3, 9, 12], тогда как в биомассе штамма, выделенного из почв г. Благовещенска, содержание этой ЖК было на уровне следов – 0,3% (табл.). Следует подчеркнуть, что данные по составу минорных и следовых ЖК в мицелии разных штаммов *A. fumigatus* различаются у всех авторов.

Содержание главной ЖК – линолевой у *A. fumigatus* было достаточно высоким у всех штаммов, изученных другими авторами, и достигало 49,7% у штамма, выделенного из тканей человека [9]. Суммарное содержание ненасыщенных ЖК больше у штамма, выделенного из экстремального местообитания – пещер Чехии [12]. Штамм *A. fumigatus*, выделенный из почв г. Благовещенска, по содержанию ЖК характеризуется более низким уровнем ненасыщенных ЖК, по сравнению со всеми штаммами, описанными в литературе, что может быть связано с температурными и другими особенностями обитания.

У *P. canescens* основную массу ЖК (76,6%) составляли кислоты с 18 атомами углерода. Главными ЖК у *P. canescens* были олеиновая 18:1, линолевая 18:2 и пальмитиновая 16:0 (табл.). По литературным данным у других видов рода *Penicillium* указанные ЖК также были главными и составляли в сумме до 84% [7]. Соотношение главных ненасыщенных ЖК (олеиновой и линолевой) можно считать таксономическим критерием рода *Penicillium* [7]. У *P. canescens*, как и у преобладающего числа видов *Penicillium*, доля линолевой кислоты была выше, чем олеиновой (табл.).

Доля ненасыщенных ЖК (олеиновой, линолевой, линоленовой и других) в липидах *P. canescens* довольно высока и достигает в среднем 72%, что соответствует литературным данным. У исследованных ранее 18 видов рода *Penicillium* содержание ненасыщенных ЖК варьировало от 68,5 до 78,5% [7]. Содержание линоленовой кислоты у *P. canescens*, как и у некоторых других видов рода *Penicillium* [7], составляло 3% (табл.). Следует отметить, что концентрация линоленовой кислоты у разных видов рода *Penicillium* значительно варьирует – от следовых количеств до 7-8%, а у некоторых видов может встречаться не только α-, но и γ- линоленовая кислоты [7].

Главными насыщенными ЖК были пальмитиновая и стеариновая, суммарная доля которых достигала 24,5%. В минорных количествах (1% и менее) идентифицированы цис-9-гексадеценвая и цис-11 эйкозеновая (табл.). В следовых количествах в липидах мицелия *P. canescens* обнаружены как короткоцепочечные ЖК – лауриновая, миристиновая, цис-9-тетрадеценвая и пентадекановая, так длинноцепочечные ЖК – гептадекановая, арахидиновая, бегеновая, лигноцериновая, нервоновая кислоты (табл.). Эти же ЖК встречались в минорных и следовых количествах в мицелии некоторых других видов рода *Penicillium* [7].

Таким образом, изучен состав ЖК двух видов мик-

ромицетов, выделенных из почв г. Благовещенска. Главными ЖК в биомассе как *A. fumigatus*, так и *P. canescens* являются линолевая, олеиновая и пальмитиновая кислоты. У *A. fumigatus* преобладает линолевая кислота (41,1%), у *P. canescens* содержание линолевой кислоты незначительно превышает содержание олеиновой (35,4 и 31,2%, соответственно). Соотношение доминирующих ЖК – линолевой и олеиновой следует считать таксономическим признаком на уровне вида, так же как и количество стеариновой и линоленовой кислот [7].

Главными насыщенными ЖК в биомассе грибов были пальмитиновая и стеариновая. Установлено более высокое содержание стеариновой кислоты (8,22%) у штамма *A. fumigatus*, выделенного из почв г. Благовещенска. ЖК состав мицелия *P. canescens*, выделенного из городских почв, характеризовался большим разнообразием минорных и следовых ЖК.

Выводы о патогенности и вирулентности изученных штаммов только на основании определения состава ЖК мицелия микромицетов сделать невозможно. В то же время выявлено, что штамм *A. fumigatus*, выделенный из городских почв, характеризуется более низким уровнем ненасыщенных ЖК в сравнении с литературными данными, что может свидетельствовать о его способности к росту при более высокой температуре. Результаты выполненных исследований представляют интерес для определения адаптивной стратегии грибов в техногенных экосистемах, а также могут быть использованы в дальнейшем для идентификации микромицетов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№12-05-31099) и Дальневосточного отделения РАН (№13-III-B-06-050; №13-III-B-09-025).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шумилова Л.П., Куимова Н.Г. Зависимость разнообразия и таксономической структуры микромицетов от степени загрязнения почв тяжелыми металлами // Регионы нового освоения: теоретические и практические вопросы изучения и сохранения биологического и ландшафтного разнообразия: сб. докл. всерос. науч. конф. с междунар. участием. Хабаровск, 2012. С.183–188.
2. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis / A. Abad [et al.] // Rev. Iberoam. Micol. 2010. Vol.27, №4. P.155–182.
3. Polar lipids of *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus* and *A. terreus* / M. Birch [et al.] // Med. Mycol. 1998. Vol.36, №3. P.127–134.
4. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extract // J. Chromatogr. 1978. Vol.151, Iss.3. P.384–390.
5. Chopra A., Khuller G.K. Lipids of pathogenic fungi // Prog. Lipid Res. 1983. Vol.22, №3. P.189–220.
6. Christensen S.A., Kolomiets M.V. The lipid language of plant-fungal interactions // Fungal Genet. Biol. 2011. Vol. 48, №1. P.4–14.
7. Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species / T.L. Da Silva [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. 1998. Vol.164, Iss.2. P.303–310.
8. Domsh K. H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag Eching, 2007. 672 p.
9. Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles / Fraga M.E. [et al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2008. Vol.103, №6. P.540–544.
10. Index fungorum. URL: <http://www.indexfungorum.org>
11. Kates M. Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids. 2nd ed. Amsterdam, New York: Elsevier, 1986. 465 p.
12. Nemec T., Jernejc K., Cimerman A. Sterols and fatty acids different *Aspergillus* species // FEMS Microbiol. Lett. 1997. Vol.149, Iss.2. P.201–205.
13. Olsson P.A. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of micorrhizal fungi in soil // FEMS Microbiol. Ecol. 1999. Vol.29. P.303–310.
14. Shea J.M., Del Poeta M. Lipid signaling in pathogenic fungi // Curr. Opin. Microbiol. 2006. Vol.9, №4. P.352–358.
15. Tekaia F., Latgé J.P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? // Curr. Opin. Microbiol. 2005. Vol.8, №4. P.385–392.

REFERENCES

1. Shumilova L.P., Kuimova N.G. *Vserossiyskaya nauchnaya konferentsiya «Regiony novogo osvoeniya: teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya i sokhraneniya biologicheskogo i landshaftnogo raznoobraziya»*: sbornik dokladov (All-Russian Conference «Regions of new development: theoretical and practical aspects of studies and conservation of biological and landscape diversity»: collected reports). Khabarovsk; 2012:183–188.
2. Abad A., Fernandez-Molina J.V., Bikandi J., Ramirez A., Margareto J., Sendino J., Hernando F.L., Ponton J., Garaizar J., Rementeria A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 2010; 27(4):155–182.
3. Birch M., Drucker D.B., Riba I., Gaskell S.J., Denning D.W. Polar lipids of *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus* and *A. terreus*. *Med. Mycol.* 1998; 36(3):127–134.
4. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extract. *J. Chromatogr.* 1978; 151(3):384–390.
5. Chopra A., Khuller G.K. Lipids of pathogenic fungi. *Prog. Lipid Res.* 1983; 22(3):189–220.
6. Christensen S.A., Kolomiets M.V. The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal Genet. Biol.* 2011; 48(1): 4–14.
7. Da Silva T.L., de Sousa E., Pereira P.T., Ferrão A.M., Roseiro J.C. Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 164(2):303–310.

8. Domsh K., H., Gams W, Anderson T.H. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag Eching; 2007.
9. Fraga M.E., Santana D.M.N., Gatti M.G., Direito G.M., Cavaglieri L.R., Rosa C.A.R. Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2008, 103(6): 540–544.
10. Index fungorum. Available at: <http://www.indexfungorum.org>
11. Kates M. Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids. 2nd ed. Amsterdam, New York: Elsevier; 1986.
12. Nemec T., Jernejc K., Cimerman A. Sterols and fatty acids different *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Let.* 1997, 149(2):201–205.
13. Olsson P.A. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of micorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1999; 29:303–310.
14. Shea J.M., Del Poeta M. Lipid signaling in pathogenic fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006; 9(4):352–358.
15. Tekaia F., Latgé J.P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* 2005, 8(4):385–392.

Поступила 15.03.2013

Контактная информация

Ирина Михайловна Котельникова,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биогеохимии,
Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,
675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1.

E-mail: Irina.kotelnikova@gmail.com

Correspondence should be addressed to

Irina M. Kotelnikova,
PhD, Senior staff scientist of Laboratory of Biogeochemistry,
Institute of Geology and Nature Management of Far Eastern Branch RAS,
1 Relochniy Lane, Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.
E-mail: Irina.kotelnikova@gmail.com