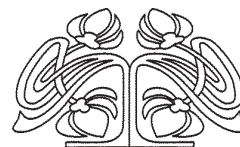




Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского»

# ИЗВЕСТИЯ

САРАТОВСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА  
Новая серия



Научный журнал  
2018 Том 18

ISSN 1816-9775 (Print)

ISSN 2541-8971 (Online)

Издается с 2005 года

Серия Химия. Биология. Экология, выпуск 3

Продолжение «Известий Императорского Николаевского Университета» 1910–1918, «Ученых записок СГУ» 1923–1962,  
«Известий Саратовского университета. Новая серия» 2001–2004

## СОДЕРЖАНИЕ

### Научный отдел

#### Химия

- Пчелинцева Н. В., Федотова О. В., Крылатова Я. Г., Лулева М. А., Кузнецова Д. Д., Баталин С. Д.** Превращения 2-пентен-, пентан-1,5-дионов и их галогензамещенных аналогов с тиоацетамидом 246
- Осипова К. А., Сенатов Д. С., Охрименко В. А., Аниськова Т. В.** Превращение n-нонана в условиях каталитического крекинга на катализаторах ZSM-5 и  $V_2O_5/ZSM-5$  252
- Решетникова И. С., Романевич А. С., Штыков С. Н.** Спектрофотометрическое изучение устойчивости растворов кверцетина и рутина при различной кислотности среды 256
- Варыгина О. В., Селифонова Е. И., Чернова Р. К.** Сенсорные системы для определения  $\alpha$ -аминокислот (обзор) 261
- Гаркушин И. К., Чугунова М. В., Бурчаков А. В., Милов С. Н.** Образование непрерывных рядов твердых растворов в солевых системах 268
- Черкасов Д. Г., Чепурина З. В., Ильин К. К.** Топологическая трансформация фазовой диаграммы разреза 2 тетраэдра состава четверной системы нитрат калия – вода – пиридин – масляная кислота в интервале 5–60°C 278
- Байбурдов Т. А., Шиповская А. Б.** Полимерные сорбенты для сбора нефтепродуктов с поверхности водоёмов: обзор русскоязычной литературы за 2000–2017 гг. (часть 3) 285
- Горбачев И. А., Глуховской Е. Г.** Изучение влияния соотношения компонентов в смешанных монослоях квантовых точек и арахиновой кислоты на морфологию пленок, полученных на их основе 299

#### Биология

- Балыкова А. Н., Носов Н. Ю., Никифоров К. А., Ерошенко Г. А.** Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного подвида средневекового биовара методом ПЦП с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени и SNP типирования 306
- Ибрагим И. М., Рыбальченко Д. А., Сигида Е. Н., Федоненко Ю. П., Коннова С. А.** Характеристика гликополимеров поверхности галофильных грамотрицательных бактерий *Chromohalobacter salexigens* EG1QL3 и *Halomonas ventosae* RU5S2EL 312
- Воробьева С. А., Дуракова О. С., Волох О. А., Громова О. В.** Возможность определения специфической активности О-АГ в производстве холерной химической вакцины с помощью дот-анализа 318
- Хумуд Б. М. Х., Апанасова Н. В., Юдакова О. И.** Введение в культуру *in vitro* партеногенетических линий кукурузы 320
- Макашова М. А., Оглодин Е. Г., Никифоров К. А., Шарапова Н. А., Ерошенко Г. А.** Анализ систематической принадлежности простейших из почв горно-алтайского высокогорного очага чумы 325
- Паршина В. В., Дятлова Ю. А., Тугарова А. В.** ИК-фурье-спектроскопический анализ накопления поли-3-гидроксисубтирата клетками *Azospirillum brasilense* при различной продолжительности культивирования и концентрации аммония в питательной среде 331
- Сажнев А. С., Миронова А. А., Аникин В. В.** Предварительные эколого-фаунистические данные о мицетофильных жесткокрылых (Insecta: Coleoptera) Саратовской области 336
- Чоботок А. С., Зинченко Е. М.** Особенности окулomotorной активности у студентов при решении задач 341
- Ибрагим И. М., Коннова С. А., Сигида Е. Н., Федоненко Ю. П., Сафронова В. И., Ейваппа К. А.** Галофильные и галотолерантные микроорганизмы – продуценты экзополисахаридов, выделенные из соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия) 345
- Брагина О. А., Семячкина-Глушковская О. В., Брагин Д. Е.** Анодная транскраниальная стимуляция постоянным током увеличивает церебральный кровоток, оксигенацию тканей и снижает неврологические нарушения у мышей в норме и в позднем посттравматическом периоде черепно-мозговой травмы 354

#### Экология

- Давиденко О. Н., Невский С. А., Давиденко Т. Н.** Информационно-техническая поддержка инвентаризации нуждающихся в охране растительных сообществ Саратовской области 361

Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (группы научных специальностей: 02.00.00 – химические науки; 03.01.00 – физико-химическая биология; 03.02.00 – общая биология; 03.03.00 – физиология)

Зарегистрировано в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-56123 от 15 ноября 2013 года

Индекс издания в объединенном каталоге «Пресса России» 36013, раздел 30 «Научно-технические издания. Известия РАН. Известия вузов». Журнал выходит 4 раза в год

#### Директор издательства

Бучко Ирина Юрьевна

#### Редактор

Каргин Игорь Анатольевич

#### Художник

Соколов Дмитрий Валерьевич

#### Редактор-стилист

Кочкаева Инна Анатольевна

#### Верстка

Ковалева Наталья Владимировна

#### Технический редактор

Каргин Игорь Анатольевич

#### Корректор

Кочкаева Инна Анатольевна

#### Адрес учредителя, издателя и редакции:

410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

Тел.: (845-2) 51-45-49, 52-26-89

E-mail: izvestiya@sgu.ru

Подписано в печать 31.08.18.

Формат 60×84 1/8.

Усл. печ. л. 14,85 (15,5).

Тираж 500 экз. Заказ 111-Т.

Отпечатано в типографии Саратовского университета.

Адрес типографии:  
410012, Саратов, Б. Казачья, 112А

© Саратовский университет, 2018



## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал публикует научные статьи по аналитической химии, органической химии, физической химии, биофизике, биохимии, биотехнологии (в том числе бионанотехнологии), ботанике, зоологии, микробиологии, экологии, энтомологии.

Объем публикуемой статьи не должен превышать 16 страниц в формате MS Word для Windows.

Статья должна быть оформлена строго в соответствии с требованиями журнала и тщательно отредактирована.

Для публикации статьи автору необходимо представить в редакцию следующие материалы и документы:

- текст статьи в электронном виде;
- два экземпляра подписанного Лицензионного договора на право использования научного произведения.

Структура подачи материала:

- на русском языке: индекс УДК, название статьи, имена, отчества и фамилии авторов, сведения об авторах (ученая степень, должность, место работы/учебы (структурное подразделение, организация, почтовый адрес), город, страна, e-mail), аннотация, ключевые слова, текст статьи, благодарности и источники финансирования работы (если есть), список литературы;

- на английском языке: название статьи, имена (полностью), отчества и фамилии авторов, сведения об авторах (ORCID, место работы/учебы (организация, почтовый адрес организации), e-mail); аннотация, ключевые слова, благодарности и источники финансирования работы (если есть).

Требования к аннотации и библиографическому списку:

- аннотация не должна содержать сложных формул, ссылок на список литературы, по содержанию повторять название статьи, быть насыщена общими словами, не излагающими сути исследования; оптимальный объем 150–200 слов;

- в списке литературы должны быть указаны только процитированные в статье работы; ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Образцы оформления различных источников приведены в правилах для авторов по адресу: <http://www.ichbe.sgu.ru/ru/ru/dlya-avtorov>.

Датой поступления статьи считается дата поступления ее окончательного варианта. Возвращенная на доработку статья должна быть прислана в редакцию не позднее чем через 3 месяца. Возвращение статьи на доработку не означает, что статья будет опубликована, после переработки она вновь будет рецензироваться. Материалы, отклоненные редколлегией, не возвращаются.

Адреса для переписки с редколлегией серии: [ichbe-sgu@yandex.ru](mailto:ichbe-sgu@yandex.ru); 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, биологический факультет, ответственному секретарю журнала «Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология». Website: <http://ichbe.sgu.ru>

## CONTENTS

### Scientific Part

#### Chemistry

- Pchelintseva N. V., Fedotova O. V., Krylatova Y. G., Lunyova M. A., Kuznetsova D. D., Batalin S. D.** Some Transformation 2-Pentene-, Pentane-1,5-Diones and Their Halogen-Substituted Analogues with Thioacetamide 246
- Osipova K. A., Senatov D. S., Ohrimenko V. A., Aniskova T. V.** The Transformation of n-nonane in Conditions of Catalytic Cracking on ZSM-5 and V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ZSM-5 Catalysts 252
- Reshetnikova I. S., Romanevich A. S., Shtykov S. N.** Spectrophotometric Study of the Stability the Quercetin and Rutin Solutions at Different Acidity of the Medium 256
- Varygina O. V., Selifonova E. I., Chernova R. K.** Sensor System for Determining  $\alpha$ -Amino Acids 261
- Garkushin I. K., Chugunova M. V., Burchakov A. V., Milov S. N.** Formation of Continuous Series of Solid Solutions in Salt Systems 268
- Cherkasov D. G., Chepurina Z. V., Il'in K. K.** Topological Transformation of Phase Diagram for Cut 2 of the Composition Tetrahedron of the Quaternary Potassium Nitrate – Water – Pyridine – Butyric Acid System within 5–60°C 278
- Bayburdov T. A., Shipovskaya A. B.** Polymeric Sorbents for the Collection of Oil and Oil Products from the Surface of Reservoirs: a 2000–2017 Review of the Russian-language Literature (Part 3) 285
- Gorbachev I. A., Gluhovskoy E. G.** The Studying of Components Ratio Influence in Mixed Monolayers of Quantum Dots and Arachidic Acid on the Films Morphology Based on Them 299

#### Biology

- Balykova A. N., Nosov N. Yu., Nikiforov K. A., Eroshenko G. A.** Differentiation of *Yersinia pestis* Strains of the Main Subspecies of Medieval Biovar by Real-Time PCR Method with Hybridization-Fluorescence Registration and SNP Typing 306
- Ibrahim I. M., Rybal'chenko D. A., Sigida E. N., Fedonenko Yu. P., Konnova S. A.** Characterization Surface Glycopolymers from Halophilic Gram-Negative Bacteria *Chromohalobacter salexigens* 1QL3 and *Halomonas ventosae* S5(2) 312
- Vorobeva S. A., Durakova O. S., Volokh O. A., Gromova O. V.** Possibility of Determination of Specific Activity of O-Ag in the Production of Cholera Chemical Vaccine by Dot-Analysis 318
- Humood B. M. H., Apanasova N. V., Yudakova O. I.** Introduction to Culture *in vitro* of Corn Parthenogenetic Lines 320
- Makashova M. A., Oglodin E. G., Nikiforov K. A., Sharapova N. A., Eroshenko G. A.** Analysis of the Systematic Appurtenance of Protozoa from the Soils of the Gorno-Altai High-mountain Plague Focus 325
- Parshina V. V., Dyatlova Yu. A., Tugarova A. V.** Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Poly-3-Hydroxybutyrate Accumulation by *Azospirillum brasilense* Cells at Various Cultivation Periods and Ammonium Concentrations in the Culture Medium 331
- Sazhnev A. S., Mironova A. A., Anikin V. V.** The Preliminary Ecological-Faunistic Data about Fungivorous Beetles (Insecta: Coleoptera) of Saratov Province 336
- Chebotok A. S., Zinchenko E. M.** Peculiarities of Oculomotor Activity in Students While Solving the Problems 341
- Ibrahim I. M., Konnova S. A., Sigida E. N., Fedonenko Yu. P., Safronova V. I., Elbanna K. A.** Exopolysaccharide-Producing Halophilic and Halotolerant Microorganisms Isolated from the Saline Lakes Qarun (Egypt) and Elton (Russia) 345
- Bragina O. A., Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Bragin D. E.** Anodal Transcranial Direct Current Stimulation Increases Cerebral Blood Flow, Tissue Oxygenation and Improves Neurological Functions in Intact Mice and in the Late Posttraumatic Period of Traumatic Brain Injury 354

#### Ecology

- Davidenko O. N., Nevskiy S. A., Davidenko T. N.** Informational and Technical Support of Needing Protection Saratov Region Plant Communities Inventory 361



**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА  
«ИЗВЕСТИЯ САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. НОВАЯ СЕРИЯ.  
СЕРИЯ: ХИМИЯ. БИОЛОГИЯ. ЭКОЛОГИЯ»**

**Главный редактор**

Шляхтин Геннадий Викторович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)

**Заместитель главного редактора**

Федотова Ольга Васильевна, доктор химических наук, профессор (Саратов, Россия)

**Ответственный секретарь**

Глинская Елена Владимировна, кандидат биологических наук, доцент (Саратов, Россия)

**Члены редакционной коллегии:**

Аникин Василий Викторович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Берберова Надежда Титовна, доктор химических наук, профессор (Астрахань, Россия)  
Богатырев Владимир Александрович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Гаркушин Иван Кириллович, доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, действительный член РАН (Самара, Россия),  
Горбунов Олег Григорьевич, доктор биологических наук, профессор (Москва, Россия)  
Горячева Ирина Юрьевна, доктор химических наук, доцент (Саратов, Россия)  
Дыкман Лев Абрамович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник (Саратов, Россия)  
Захаров Владимир Михайлович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН (Москва, Россия)  
Золотухин Вадим Викторович, доктор биологических наук, доцент (Ульяновск, Россия)  
Кашин Александр Степанович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Кулагин Алексей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ и Республики Башкортостан (Уфа, Россия),  
Кулиш Елена Ивановна, доктор химических наук, доцент (Уфа, Россия)  
Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор (Москва, Россия)  
Никитина Валентина Евгеньевна, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Опарин Михаил Львович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Позднякова Наталия Николаевна, доктор биологических наук (Саратов, Россия)  
Ревин Виктор Васильевич, доктор биологических наук, профессор (Саранск, Россия)  
Розенберг Геннадий Самуилович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН (Тольятти, Россия)  
Шиповская Анна Борисовна, доктор химических наук, доцент (Саратов, Россия)  
Штыков Сергей Николаевич, доктор химических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Щеголев Сергей Юрьевич, доктор химических наук, профессор (Саратов, Россия)  
Юдакова Ольга Ивановна, доктор биологических наук, доцент (Саратов, Россия)

**EDITORIAL BOARD OF THE JOURNAL  
«IZVESTIYA OF SARATOV UNIVERSITY. NEW SERIES.  
SERIES: CHEMISTRY. BIOLOGY. ECOLOGY»**

**Editor-in-Chief** – Gennady V. Shlyakhtin (Saratov, Russia)

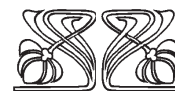
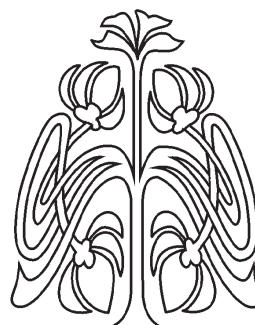
**Deputy Editor-in-Chief** – Olga V. Fedotova (Saratov, Russia)

**Executive Secretary** – Elena V. Glinskay (Saratov, Russia)

**Members of the Editorial Board:**

Vasili V. Anikin (Saratov, Russia)  
Nadezhda T. Berberova (Astrakhan, Russia)  
Vladimir A. Bogatyrev (Saratov, Russia)  
Ivan K. Garkushin (Samara, Russia)  
Oleg G. Gorbunov (Moscow, Russia)  
Irina Ju. Goryacheva (Saratov, Russia)  
Lev A. Dykman (Saratov, Russia)  
Galina A. Eroshenko (Saratov, Russia)  
Vladimir M. Zacharov (Moscow, Russia)  
Vadim V. Zolotuhin (Ulyanovsk, Russia)  
Alexandr S. Kashin (Saratov, Russia)  
Svetlana A. Konnova (Saratov, Russia)

Alexey Yu. Kulagin (Ufa, Russia)  
Elena I. Kulish (Ufa, Russia)  
Georgy V. Maksimov (Moscow, Russia)  
Valentina E. Nikitina (Saratov, Russia)  
Michail L. Oparin (Saratov, Russia)  
Natalia N. Pozdnyakova (Saratov, Russia)  
Viktor V. Revin (Saransk, Russia)  
Gennady S. Rozenberg (Toliatty, Russia)  
Anna B. Shipovskay (Saratov, Russia)  
Sergey N. Shtykov (Saratov, Russia)  
Sergey Ju. Shchyogolev (Saratov, Russia)  
Olga I. Yudakova (Saratov, Russia)



**РЕДАКЦИОННАЯ  
КОЛЛЕГИЯ**





## ХИМИЯ

УДК 547.316+547.388.3+547.771+547.779+547.892

### ПРЕВРАЩЕНИЯ 2-ПЕНТЕН-, ПЕНТАН-1,5-ДИОНОВ И ИХ ГАЛОГЕНЗАМЕЩЕННЫХ АНАЛОГОВ С ТИОАЦЕТАМИДОМ

Н. В. Пчелинцева, О. В. Федотова, Я. Г. Крылатова,  
М. А. Лунева, Д. Д. Кузнецова, С. Д. Баталин

Пчелинцева Нина Васильевна, доктор химических наук, профессор кафедры органической и биоорганической химии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, PchelintzevaNV555@mail.ru

Федотова Ольга Васильевна, доктор химических наук, заведующий кафедрой органической и биоорганической химии, директор Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Fedotova\_ov2rambler.ru

Крылатова Яна Георгиевна, кандидат химических наук, доцент кафедры органической и биоорганической химии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, yana.krylatova@yandex.ru

Лунева Марина Анатольевна, кандидат химических наук, заведующий отделением «Фармация», Саратовский областной базовый медицинский колледж, menshovama777@mail.ru

Кузнецова Дарья Дмитриевна, инженер-химик, ООО «Экологический центр Сигма», Саратов, dashaaver@mail.ru

Баталин Сергей Дмитриевич, магистрант Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, batalinsd@bk.ru

Изучены реакции 2-пентен-, пентан-, 2,4-дихлор-2-пентен- и 2,4-дихлор(бром)пентан-1,5-дионов с тиацетамидом. В зависимости от строения 1,5-дикетона имеет место конденсация при участии оксогруппы пропанонильного фрагмента 2-пентен-1,5-дионов с образованием 5-оксо-1,3,5-триарилпент-3-енилидентиацетамидов, либо гетероциклизация при участии  $\alpha$ -галогенкетонного фрагмента с образованием замещенных тиазолов.

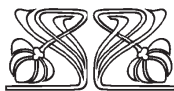
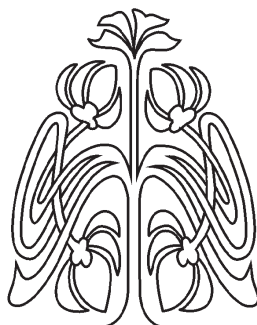
**Ключевые слова:** 2-пентен-1,5-дионы, пентан-1,5-дионы,  $\alpha$ -хлор(бром)пентен(ан)-1,5-дионы, гетероциклизация, тиазолы.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-246-251

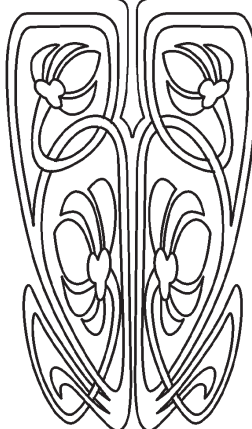
Учитывая способность 1,5-дикарбонильных соединений превращаться в присутствии аммиака, мочевины и их производных в N-содержащие гетероциклические соединения [1–3], нами впервые изучена возможность циклизации 2-пентен- и пентан-1,5-дионов, их дигалогензамещенных аналогов **1-5** с тиамидами карбоновых кислот.

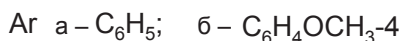
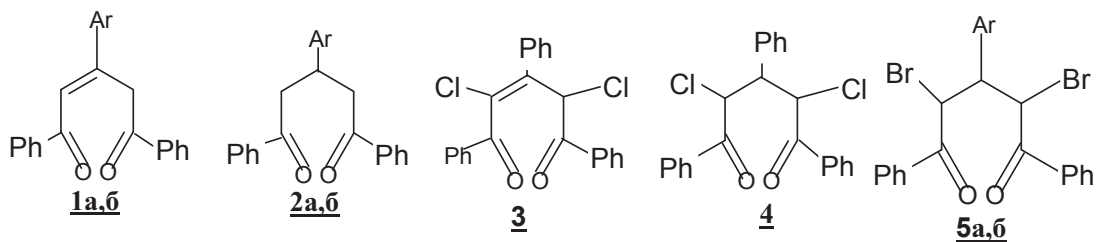
Круг выбранных нами 1,5-дикетонов подразделяется на  $\alpha,\beta$ -непредельные **1а,б, 3** и насыщенные **2а,б, 4, 5а,б**, хлор- и бромзамещенные аналоги, отличающиеся природой заместителей в арильном фрагменте и характером оксогрупп.

© Пчелинцева Н. В., Федотова О. В., Крылатова Я. Г.,  
Лунева М. А., Кузнецова Д. Д., Баталин С. Д., 2018



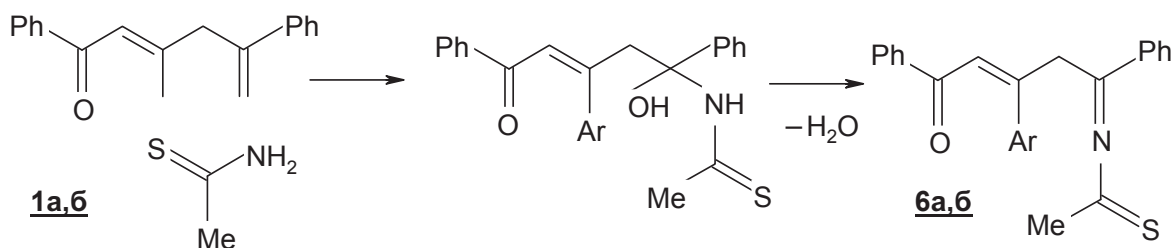
НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





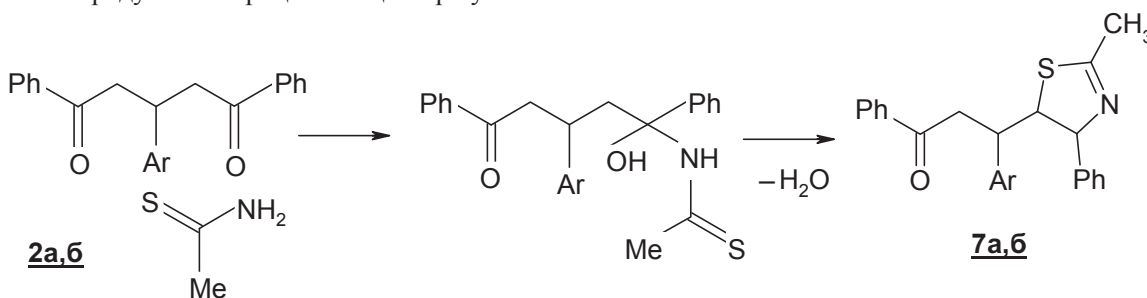
Располагая разработанными ранее [4] методами синтеза пентен-, пентан-1,5-дионов, их дихлор- и дибромзамещенных аналогов, используя различные реакционные центры указанных субстратов: карбонильную функцию, α,β-непредельный кетонный фрагмент, α-галогенкарбонильный центр, осуществлены превращения с тиацетамидом.

Нами установлено, что циклизации пентендионов **1a,b** под действием тиацетамида в отсутствие катализатора не происходит, а имеет место конденсация при участии оксофункции, свободной от сопряжения, с образованием продуктов **6a,b** – 5-оксо-1,3,5-трифенил- и 5-оксо-3(4-метоксифенил)-1,5-дифенилпент-3-енилидентиацетамидов с выходом 80 и 63% соответственно.



В результате превращения арилзамещенных пентандионов **2a,b** с тиацетамидом были выделены продукты гетероциклизации при участии

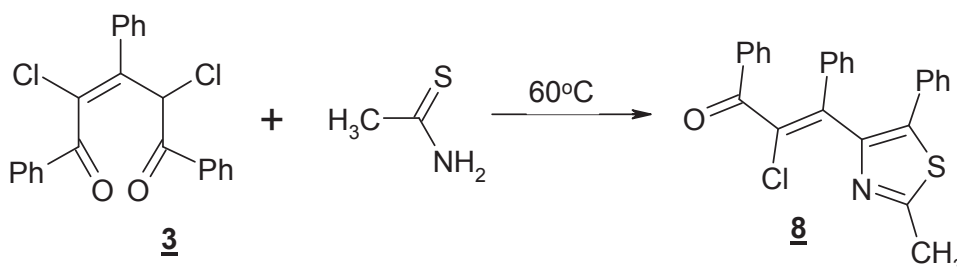
пропанонильного фрагмента – замещенные 4,5-дигидротиазолы **7a,b** с выходом 68 и 73% соответственно.



Установлено, что взаимодействие дихлор-дикетонов с тиацетамидом завершается образованием продуктов конденсации при участии карбонильной функции и галогена в α-положении. Однако, учитывая различную подвижность галогена при атоме углерода в sp<sup>2</sup>-гибридации в ди-

хлорпентендионе **3**, sp<sup>3</sup>-гибридации в дихлор-**4** и дибромпентандионах **5a,b**, выделены моно-**8,9a** либо бисметиларилтиазолы **10a,b**.

При взаимодействии 1,3,5-трифенил-2,4-дихлор-2-пентен-1,5-диона **3** с тиацетамидом был получен продукт **8**.



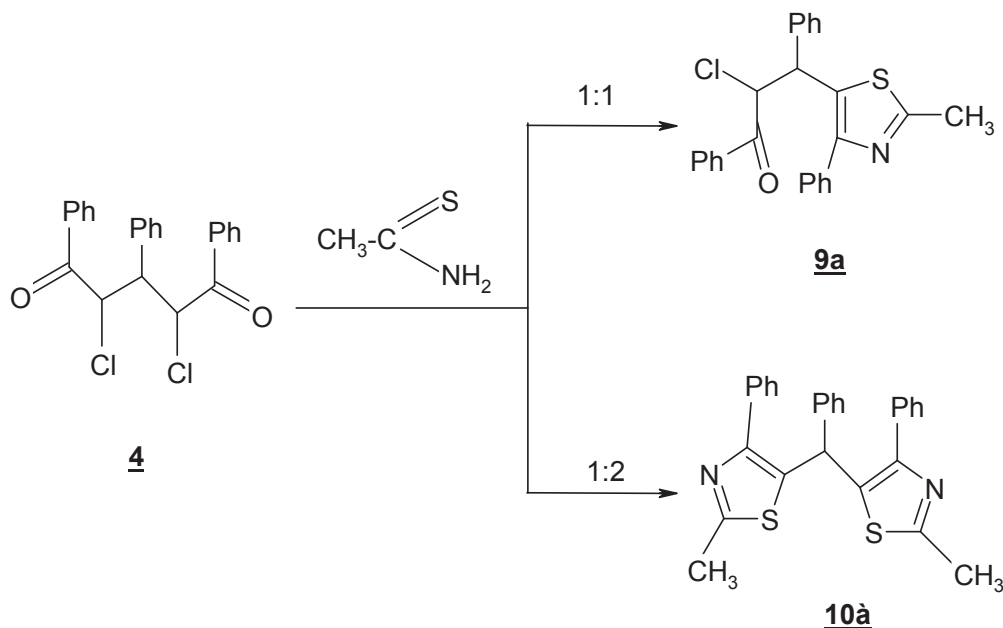


Показано, что в реакциях с  $\alpha$ -галогенкетонами тиоацетамид, участвуя в иминотиольной форме, приводит к гетероциклизации [5–7], образуя тиазолы. Обнаружено, что при взаимодействии дихлорпентен-**3** и пентан-(**4**)-1,5-дионов с тиоацетамидом в соотношении субстрат : реагент = 1 : 2 возникают замещенные тиазолы: 3-(2-метил-4-фенилтиазол-5-ил)-2-хлоро-1,3-

дифенилпропенон **8** и ди-(2-метил-4-фенилтиазол-5-ил)-фенилметан **10a**.

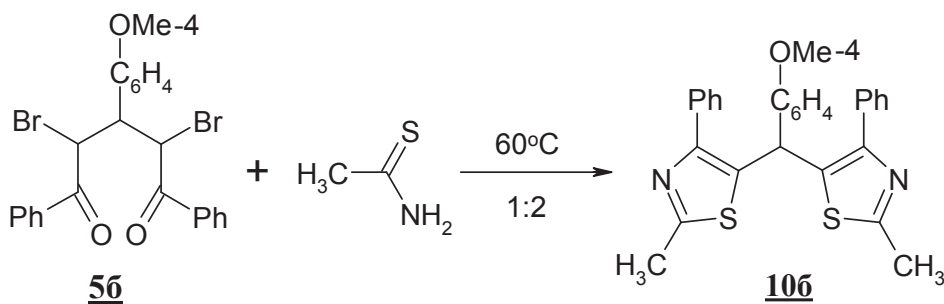
Галоген при кратной C=C связи и в реакции с тиоацетамидом по-прежнему остается неактивным вне зависимости от соотношения реагентов.

В зависимости от соотношения субстрат : реагент реакция дихлорпентандиона **4** протекает с образованием продуктов **9a** и **10a**.



Превращения дибромпентандионов **5a,б** с тиоацетамидом проходят аналогично взаимодействию с ним 1,3,5-трифенил-2,4-дихлорпентан-1,5-диона **4**, при участии

двух  $\alpha$ -галогенкарбонильных фрагментов, давая биспродукты - 4-((4-арил)(2-метил-5-фенилтиазол-4-ил)метил)-2-метил-5-енилтиазолы **10a,б**.



В отличие от дигалогенпентандионов **4,5a,б**, образующих бистиазолы **10a,б** с тиоацетамидом, при нагревании 2,4-дихлор-1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-диона **3** с последним в *p*-ксилоле биспродукт не образуется; возникает тиазол **8**.  $\alpha,\beta$ -Непредельный фрагмент или малоподвижный атом хлора при двойной связи не принимают участия в реакции с тиоацетамидом; дезактивированная атомом хлора кратная связь в противо-

положность таковой в рассмотренных выше незамещенных аналогах не реакционноспособна.

Строение продуктов установлено на основании данных ЯМР- и ИК-спектроскопии.

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  бистиазола **10a,б** присутствуют мультиплеты ароматических протонов при  $\delta$  7,32–6,52 м.д. и метинового  $\text{H}^3$  при  $\delta$  4,99–4,93 м.д., сигналы метильных протонов при  $\delta$  2,04 и 2,47 м.д. (таблица).



**Условия реакций (галоген)арилзамещенных пентан-, 2-пентен-1,5-дионов с тиаоацетамидом при кипячении и характеристики продуктов**

№ соединения	Растворитель	Соотношение реагентов	Время реакции	№ продукта	Выход, %	T <sub>пл</sub> , °C (растворитель)
<b>1a</b>	EtOH(абс)	1:1	9,5 ч	<b>6a</b>	80	92–93(EtOH)
<b>1б</b>	EtOH(абс)	1:1	32,5 ч	<b>6б</b>	63	182–183(EtOH)
<b>2a</b>	п-ксилол	1:1	20 мин	<b>7a</b>	68	89–90(i-PrOH)
<b>2б</b>	п-ксилол	1:1	35 мин	<b>7б</b>	73	98–100(i-PrOH)
<b>3</b>	п-ксилол	1:1	1,5 ч	<b>8</b>	74	106–107(i-PrOH)
		1:2	1,5 ч	<b>8</b>	81	–
<b>4</b>	п-ксилол	1:1	1,5 ч	<b>9a</b>	60	118–119(i-PrOH)
<b>4</b>	п-ксилол	1:2	1,5 ч	<b>10a</b>	54	123–124(i-PrOH)
<b>5a</b>	п-ксилол	1:2	1,5 ч	<b>10a</b>	80	–
<b>5б</b>	п-ксилол	1:2	40 мин	<b>10б</b>	61	106–108(i-PrOH)

В спектре ЯМР <sup>13</sup>C соединения **10a** имеются сигналы при δ 170,83 (C<sup>2</sup>), 136,75 (C<sup>4</sup>), 134,06 (C<sup>5</sup>) м.д. тиазольного цикла [8], 132,24–127,52 м.д. (атомы углерода бензольных колец, 19,57 м.д и 57,23 м.д. углеродов метильных групп.

В ИК-спектрах 5-оксопентенилидентиаоацетамидов **6a,б** в области поглощения оксогрупп сохраняются только полосы в области с ν 1683–1684 см<sup>-1</sup>, относящиеся к колебанию связей C=O групп, сопряженных с C=C (1648–1646 см<sup>-1</sup>) связью и фенильным фрагментом. Появление полос в области 1676–1650 (C=N) и 1512–1482 см<sup>-1</sup> (C=S) свидетельствует об участии свободного карбонила в превращении с тиаоацетамидом. Напротив, в дигидротиазолах **7a,б** сохраняются полосы свободного от сопряжения карбонила (1728–1726 см<sup>-1</sup>) и имеются полосы при 1586–1580 см<sup>-1</sup> (C=N), 1262–1210 см<sup>-1</sup> (C-S) дигидротиазольного цикла [9]. Набор полос в области 1675–1660 см<sup>-1</sup> (C=C), 1560–1552 см<sup>-1</sup> (C=N) и 1285–1190 см<sup>-1</sup> (C-S) в спектрах соединений **8,9a,б,10a,б** указывает на присутствие тиазольного цикла в их структуре [10].

Реакция α-галоген-1,5-дикетонов с тиаоацетамидом представляет интерес как удобный метод синтеза ранее труднодоступных замещенных тиазолов.

Синтез субстратов **1a,б, 2a,б, 3, 4, 5a,б** описан ранее [4]. Строение синтезированных соединений подтверждено данными ИК и ЯМР <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-спектроскопии. <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР-спектры зарегистрированы на приборе Bruker MSL-400. ИК-спектры записаны на спектрометре Specord M-80.

Контроль за ходом реакций и индивидуальностью выделенных соединений осуществлялся методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254 (элюент-гексан:эфир:хлороформ=4:1:1).

Общая методика проведения реакции дикетонов **1a,б, 2a,б,3,4,5a,б** с тиаоацетамидом заключается в следующем: в круглодонную колбу ёмкостью 50 мл помещают раствор 0,025 моль дикетона в 20 мл растворителя, 0,025–0,05 моль тиаоацетамида. Смесь нагревают. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, сушат.

**5-оксо-1,3,5-трифенилпент-3-енилидентиаоацетамид (6a).** Раствор 8,2 г (0,025 моль) 1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-диона (**1a**) в 20 мл абсолютного этилового спирта, 1,9 г (0,025 моль) тиаоацетамида кипятят в течение 9,5 часов. Кристаллический продукт отделяют, промывают этиловым спиртом, сушат. Выход 7,6 г (80%), бесцветные кристаллы, т.пл. 92–93°C (этанол). Найдено, %: C-78.6, H-5.3, N-3.6, S-8.2. C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>NOS. Вычислено, %: C-78.3, H-5.5, N-3.7, S-8.4. ИК-спектр, ν, см<sup>-1</sup>: 1683 (C=O), 1648 (C=C), 1676 (C=N), 1512 (C=S).

**5-оксо-3(4-метоксифенил)-1,5-дифенилпент-3-енилидентиаоацет-амид (6б).** Раствор 8,9 г (0,025 моль) 1,5-дифенил-3(4-метоксифенил)-2-пентен-1,5-диона (**1б**) в 20 мл абсолютного этилового спирта, 1,9 г (0,025 моль) тиаоацетамида кипятят в течение 32,5 часов. Кристаллический продукт отделяют, промывают этиловым спиртом, сушат. Выход 6,3 г (63%), бесцветные кристаллы, т.пл. 182–183°C (этанол). Найдено, %: C- 74.6, H-5.3, N-3.6,



S-8.2.  $C_{25}H_{23}NO_2S$ . Вычислено, %: C-74.8, H-5.7, N-3.5, S-8.0. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1684 (C=O), 1646 (C=C), 1650 (C=N), 1482 (C=S).

**2-метил-4-фенил-5(1,3-дифенилпропанон-3-ил)-4,5-дигидротиазол (7a)**. Раствор 8,2 г (0,025 моль) 1,3,5-трифенилпентан-1,5-диона (**2a**) в 20 мл п-ксилола, 1,9 г (0,025 моль) тиоацетамида кипятят в течение 20 мин. Кристаллический продукт отделяют, промывают этиловым спиртом, сушат. Выход 6,6 г (68%), бесцветные кристаллы, т.пл. 89–90°C (пропанол-2). Найдено, %: C- 78.1, H-5.9, N-3.5, S-8.4.  $C_{25}H_{23}NOS$ . Вычислено, %: C-77.9, H-6.0, N-3.6, S-8.3. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1728 (C=O), 1586 (C=N -кольца), 1262 (C-S- кольца).

**2-метил-4-фенил-5(1(4-метоксифенил)-3-фенилпропанон-3-ил)-4,5-дигидротиазол (7b)**. Раствор 8,9 г (0,025 моль) 1,5-дифенил-3(4-метоксифенил)пентан-1,5-диона (**2b**) в 20 мл п-ксилола, 1,9 г (0,025 моль) тиоацетамида кипятят в течение 35 мин. Кристаллический продукт отделяют, промывают этиловым спиртом, сушат. Выход 7,6 г (73%), бесцветные кристаллы, т.пл. 98–100°C (пропанол-2). Найдено, %: C-75.4, H-5.9, N-3.5.  $C_{26}H_{25}NO_2S$ . Вычислено, %: C-75.1, H-6.1, N-3.4. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1726 (C=O), 1580 (C=N -кольца), 1190 (C-S- кольца).

**3(2-метил-4-фенилтиазол-5-ил)-2-хлор-1,3-дифенилпропанон (8)**. Раствор 9,9 г (0,025 моль) 1,3,5-трифенил-2,4-дихлор-2-пентен-1,5-диона (**3**) в 20 мл п-ксилола, 1,9 г (0,025 моль) тиоацетамида кипятят в течение 1,5 час. Кристаллический продукт отделяют, промывают этиловым спиртом, сушат. Выход 7,7 г (74%), бесцветные кристаллы, т.пл. 106–107°C (пропанол-2). Найдено, %: C- 72.1, H-4.6, N 3.5.  $C_{25}H_{18}ClNOS$ . Вычислено, %: C-72.2, H-4.4, N-3.4. ИК спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1675 (C=C), 1560 (C=N -кольца), 1285 (C-S- кольца). Исходя из 0.025 моль **3** и 0.05 моль тиоацетамида, получено 8.4 г (81%) **8**.

**3(2-метил-4-фенилтиазол-5-ил)-2-хлор-1,3-дифенилпропанон(9a)**. Раствор 10.0 г (0,025 моль) 1,3,5-трифенил-2,4-дихлорпентан-1,5-диона (**4**) в 20 мл п-ксилола, 1,9 г (0,025 моль) тиоацетамида кипятят в течение 1,5 час. Кристаллический продукт отделяют, промывают этиловым спиртом, сушат. Выход 6.3 г (60%), бесцветные кристаллы, т.пл. 118–119°C (пропанол-2). Найдено, %: C-72.0, H-4.7, N-3.6.  $C_{25}H_{20}ClNOS$ .

Вычислено, %: C-71.8, H-4.8, N-3.4. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1672 (C=C-кольца), 1555 (C=N -кольца), 1280 (C-S- кольца).

**Ди-(2-метил-4-фенилтиазол-5-ил)фенилметан (10a)**. Раствор 10.0 г (0,025 моль) 1,3,5-трифенил-2,4-дихлорпентан-1,5-диона (**4**) в 20 мл п-ксилола, 3.8 г (0,05 моль) тиоацетамида кипятят в течение 1,5 часов. Кристаллический продукт отделяют, промывают этиловым спиртом, сушат. Выход 5.9 г (54%), бесцветные кристаллы, т.пл. 123–124°C (пропанол-2). Найдено, %: C-74.0, H-4.9, N-6.3.  $C_{27}H_{22}N_2S_2$ . Вычислено, %: C-73.9, H-5.1, N-6.4. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1662 (C=C-кольца), 1558 (C=N-кольца), 1280 (C-S-кольца). Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 7.30–6.52 (15H, Ar), 4.99 (метиновый  $H^3$ ). Спектр ЯМР  $^{13}C$ ,  $\delta$ , м.д.: 170,83 ( $C^2$ ), 136,75 ( $C^4$ ), 134,06 ( $C^5$ ) тиазольного цикла, 132,24–127,52 (Ar), 19,57 ( $CH_3$ ), 57,23 ( $OCH_3$ ). При использовании 1,3,5-трифенил-2,4-дибромпентан-1,5-диона (**5a**) выход **10a** – 80%.

**Ди-(2-метил-4-фенилтиазол-5-ил)(4-метоксифенил)метан (10b)**. Раствор 10.0 г (0,025 моль) 1,5-дифенил-3(4-метоксифенил)-2,4-дибромпентан-1,5-диона (**5b**) в 20 мл п-ксилола, 3.8 г (0,05 моль) тиоацетамида кипятят в течение 40 мин. Кристаллический продукт отделяют, промывают этиловым спиртом, сушат. Выход 6.9 г (61%), бесцветные кристаллы, т.пл. 106–108°C (пропанол-2). Найдено, %: C-74.0, H-4.9, N-6.3.  $C_{28}H_{24}N_2S_2$ . Вычислено, %: C-74.3, H-5.3, N-6.2. ИК-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1660 (C=C-кольца), 1552 (C=N -кольца), 1190 (C-S- кольца). Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.д.: 7.32–6.50 (14H, Ar), 4.93 (метиновый  $H^3$ ), 2,04 (3H,  $CH_3$ ), 2.47 (3H,  $OCH_3$ ).

#### Список литературы

1. Московкина Т. В., Тиличенко М. Н. Синтез гетероциклов на основе гидразонов 1,5-дикетонов // Химия гетероцикл. соед. 1983. № 5. С. 821–830.
2. Donchak L. N., Zabolotnova T. V., Kaminsky V. A. Chemistry of Dicarboxyl Compounds. Riga, 1981. P. 69–71.
3. Пчелинцева Н. В., Харченко В. Г., Маркова Л. И., Федотова О. В. Реакции 1,5-дикетонов с аммиаком и его замещенными // Химия гетероцикл. соед. 2003. № 9. С. 1283–1304.
4. Харченко В. Г., Пчелинцева Н. В. Способы получения 1,5-дикетонов. Саратов, 1997. 104 с.
5. Shafer H., Gewald K. Reaktionen mit 4-amino-5-benzoylthiazolen // J. Prakt. Chem. 1974. № 19. P. 684–692.
6. Шклярченко А. А., Наследов Д. Г., Яковлев В. В. [(2,3-дибромпропил)-сульфонил]арены в S,N-





- тандемных реакциях гетероциклизации. Новый путь синтеза триазолотиазолидинов // ЖОрХ. 2005. Т. 41, вып. 4. С. 636–637.
7. Hasherni M. M., Asabollahi H., Mostaghiri R. Синтез производных битазола в условиях микроволнового облучения в отсутствие растворителя // ЖОрХ. 2005. Т. 41, вып. 7. С. 632–633.
  8. Лякина А. Ю., Михура И. В., Попова И. С., Формановский А. А. Особенности синтеза замещенных и конденсированных 2-метил-1,3-тиазолов // ХГС. 2005. № 8. С. 1244–1249.
  9. Куватов З. Х., Сафаров М. Г., Мурза М. М. Новые производные тиазола с мезоморфными свойствами // ХГС. 2004. № 4. С. 596.
  10. Некрасов Д. Д., Обухова А. С. Синтез и химические свойства 2-замещенных тиазолин-4,5-дионов // ХГС. 2006. № 9. С. 1283.

#### Some Transformation 2-Pentene-, Pentane-1,5-Diones and Their Halogen-Substituted Analogues with Thioacetamide

N. V. Pchelintseva, O. V. Fedotova, Y. G. Krylatova, M. A. Lunyova, D. D. Kuznetsova, S. D. Batalin

Nina V. Pchelintseva, ORCID 0000-0002-5830-9807, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, PchelintsevaNV555@mail.ru

Olga V. Fedotova, ORCID 0000-0003-3941-4027, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, Fedotova\_ov2@rambler.ru

Jana G. Krylatova, ORCID 0000-0002-9486-6774, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, yana.krylatova@yandex.ru

Marina A. Lunyova, ORCID 0000-0001-9476-4658, Saratov Regional Base Medical College, 151, Chernyshevskaya Str., Saratov, 410028, Russia, menshovama777@mail.ru

Daria D. Kuznetsova, ORCID 0000-0001-6625-2532, "Ecological Center Sigma", 22, Michurina Str., Saratov, 410012, Russia, dashaaver@mail.ru

Sergey D. Batalin, ORCID 0000-0001-6771-230X, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, batalinsd@bk.ru

Given the ability of 1,5-dicarbonyl compounds to emerge in the presence of ammonia, urea and its derivatives of N-containing heterocyclic compounds, possibility of cyclization 2-pentene- and pentane-1,5-diones and their dihalogen-substituted analogues with thioacetamide. When boiling pentenedions with thioacetamide in ethanol occurs condensation with the participation of oxo-function, free of the pairing, with the formation of 5-oxo-1,3,5-triaryl-pent-3-enilidithioacetamide with access 63-80%; pentanedions when heated in xylene for 20–35 minutes give heterocyclic products with the participation of the propanonic fragment - substituted 4,5-dihydrothiazoles with access 68-73%. Unlike dichloro(bromine) pentanedions forming bithiazoles with thioacetamide, when heated, 2,4-dichloro-1,3,5-triphenyl-2-pentene-1,5-dione with the latest in p-xylene bisproduct is not formed; occurs 3-(2-methyl-4-phenylthiazol-5-yl)-2-chloro-1,3-diphenylpropanone with the release of 81%.  $\alpha,\beta$ -Unsaturated fragment or sedentary chlorine atom with the double bond did not participate in the reaction with thioacetamide; a chlorine atom form a multiple relationship as opposed to such, discussed above unsubstituted analogues, has low reactivity. Structure of products installed on the basis of the data of the NMR and IR spectroscopy. The reaction of  $\alpha$ -halogen-1,5-diketones with thioacetamide is of interest as a convenient method for the synthesis of previously hard-to-substituted thiazoles.

**Key words:** 2-pentene-1,5-diones, pentane-1,5-diones,  $\alpha$ -chloro(bromine)pentene(ane)-1,5-diones, heterocyclization, thiazoles.

#### Образец для цитирования:

Пчелинцева Н. В., Федотова О. В., Крылатова Я. Г., Лунева М. А., Кузнецова Д. Д., Баталин С. Д. Превращения 2-пентен-, пентан-1,5-дионов и их галогензамещенных аналогов с тиоацетамидом // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 246–251. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-246-251

#### Cite this article as:

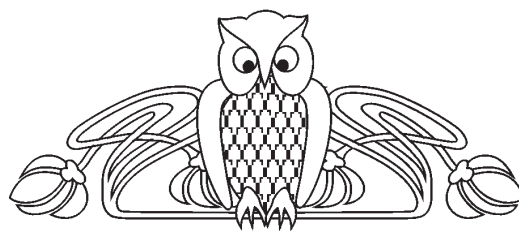
Pchelintseva N. V., Fedotova O. V., Krylatova Y. G., Lunyova M. A., Kuznetsova D. D., Batalin S. D. Some Transformation 2-Pentene-, Pentane-1,5-Diones and Their Halogen-Substituted Analogues with Thioacetamide. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 246–251 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-246-251



УДК 544.478.13

## ПРЕВРАЩЕНИЕ *n*-НОНАНА В УСЛОВИЯХ КАТАЛИТИЧЕСКОГО КРЕКИНГА НА КАТАЛИЗАТОРАХ ZSM-5 И V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ZSM-5

К. А. Осипова, Д. С. Сенатов, В. А. Охрименко, Т. В. Аниськова



Осипова Кристина Александровна, студентка кафедры нефтехимии и техногенной безопасности, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, osipovaka18@mail.ru

Сенатов Дмитрий Станиславович, студент кафедры нефтехимии и техногенной безопасности, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, senatovds@yandex.ru

Охрименко Вадим Алексеевич, студент кафедры нефтехимии и техногенной безопасности, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, vadim.ohrimenko1@gmail.com

Аниськова Татьяна Владимировна, кандидат химических наук, доцент кафедры нефтехимии и техногенной безопасности, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, aniskovatv@mail.ru

Растущий спрос на качественные моторные топлива требует постоянного усовершенствования и модернизации существующих технологий переработки нефти. В промышленности одним из основных вторичных процессов переработки углеводородного сырья, позволяющих получать высокооктановые компоненты автомобильных бензинов, ценные сжиженные газы, а также сырьё для нефтехимических производств, является каталитический крекинг различных видов дистиллятного и остаточного сырья. В настоящее время большинство промышленных катализаторов каталитического крекинга содержат в своем составе дорогостоящие редкоземельные элементы и платину. Поэтому разработка более дешевых, высоко активных и стабильно работающих каталитических систем превращения *n*-углеводородов является актуальной задачей. В связи с этим целью данной работы явилось исследование каталитической системы на основе цеолита ZSM-5 (M=60), промотированной пятиоксидом ванадия, и оценка влияния модифицирующей добавки V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> на превращения *n*-нонана. Исследование проводили на лабораторной установке с реактором проточного типа со стационарным слоем катализатора. В качестве сырья использовали *n*-гексан. Анализ превращения *n*-нонана позволяет говорить, что введение модифицирующей добавки дает возможность получать ценные газообразные продукты и жидкие продукты с высоким октановым числом, которые могут быть использованы в качестве компонентов моторных топлив.

**Ключевые слова:** каталитический крекинг, катализаторы, превращения *n*-нонана, бензин, цеолит.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-252-255

Постоянное ужесточение требований к характеристикам моторных топлив, неуклонный рост потребления высококачественных моторных топлив

и исчерпание запасов нефти делают актуальной задачей разработку новых каталитических гетерогенных систем, позволяющих получать моторные топлива, соответствующие современным экологическим стандартам и нормативам.

Процесс каталитического крекинга является одним из наиболее распространенных крупнотоннажных процессов углубленной переработки нефти, позволяющих получать с максимально высоким выходом (до 50% и более) высокооктановый бензин и ценные сжиженные газы – сырьё для последующих производств высокооктановых компонентов бензинов изомерного строения: алкилата и метилтретбутилового эфира, а также сырья для нефтехимических производств.

Одна из важнейших задач совершенствования процесса каталитического крекинга – это создание новых эффективных каталитических систем, которые не содержат в своем составе благородных и редкоземельных металлов [1–7].

Исследования активности цеолитсодержащего катализатора проводили на лабораторной установке проточного типа со стационарным слоем катализатора, при атмосферном давлении, в интервале температур 450–600°C (шаг 50°C), при объемной скорости подачи сырья 0,1 ч<sup>-1</sup>. В качестве сырья использовали *n*-нонан. Активирование катализатора проводили в токе воздуха при температуре 500°C в течение двух часов.

Синтетический, высококремнистый цеолит типа ZSM-5 характеризуется большим объёмом пор, высокой кислотностью, хорошей гидротермальной стабильностью, а также молекулярно-ситовыми свойствами, что позволило использовать его в качестве матрицы для создания каталитической системы [8–10].

В результате конверсии *n*-нонана на исследуемом катализаторе получены жидкие продукты сложного многокомпонентного состава с количеством углеродных атомов в цепи от C<sub>1</sub> до C<sub>15</sub> и газы, содержащие в своем составе водород, моно- и диоксид углерода и углеводороды C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, анализ которых осуществлялся на хроматографах Кристалл-5000 и Кристалл-2000 с линейным программированием температуры с 35 до 250°C. Расчет осуществлялся с помощью программы



«Хроматэк Аналитик», позволяющей установить детальный состав углеводородных смесей (вес., об., моль. %), относительную плотность, фракционный состав и октановое число продукта.

Эффективность превращения *n*-нонана на катализаторе оценена по следующим параметрам: степень превращения *n*-нонана, выход бутан-бутиленовой и пропан-пропиленовой фракций, а также сухого газа (фракция  $C_1$ - $C_2$ ), используемого

в качестве топлива для нужд НПЗ, ароматических углеводородов, а также алканов и изоалканов и изменению октанового числа в зависимости от температуры.

Конверсия *n*-нонана для двух каталитических систем возрастает с увеличением температуры, и достигает максимального значения при 600°C, 95% и 91,0% на катализаторах  $V_2O_5/ZSM-5(M-60)$  и  $ZSM-5(M-60)$  соответственно (рис. 1).

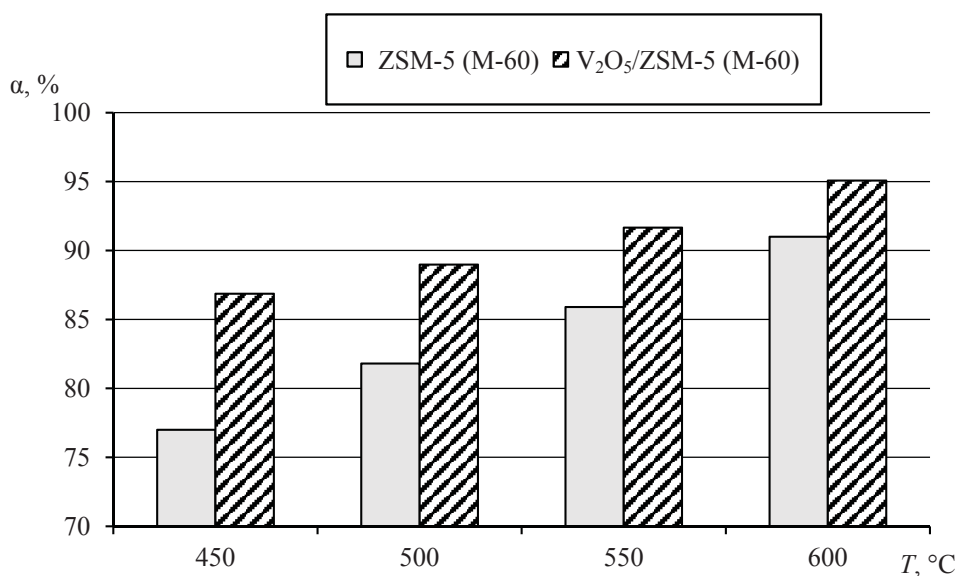


Рис. 1. Зависимость степени превращения *n*-нонана от температуры процесса

С ростом температуры наблюдается интенсификация реакций крекинга, о чем свидетельствует увеличение суммарного содержания газообразных продуктов  $C_1$ - $C_5$ , как для промотированного катализатора, так и для носителя в интервале температур 450–550°C.

При температуре 600 °C для каталитической системы  $V_2O_5/ZSM-5(M-60)$  наблюдается резкое уменьшение содержания газообразных углеводородов  $C_1$ - $C_5$ , что, вероятно, можно объяснить частичной перестройкой структуры ванадиевого катализатора, как следствие, данный катализатор теряет свою активность.

Выход метана при увеличении температуры процесса увеличивается с 1,8 до 10,3% на цеолите, а на  $V_2O_5/ZSM-5(M-60)$  увеличивается с 3,1 до 14,2%. Выход фракции  $C_3$ - $C_4$  уменьшается с ростом температуры для двух каталитических систем. На цеолите с 42,5 % до 19,37. А на модифицированном катализаторе  $V_2O_5/ZSM-5(M-60)$  с 43,7% до 2,15%.

При каталитическом крекинге *n*-нонана выход изопарафинов резко падает при увеличении температуры процесса и максимальное значение 9,1% отмечается при температуре 450 °C на ка-

тализаторе  $V_2O_5/ZSM-5(M-60)$ , а на катализаторе  $ZSM-5(M-60)$  5,7%, что объясняется введением модифицирующей добавки, это влечет за собой перераспределение реакционных центров (металлических и кислотных) и изменение вклада соответствующих реакций.

Основными критериями качества получаемого жидкого продукта в процессе каталитического крекинга является показатель октанового числа и содержания ароматических углеводородов.

В данном случае при превращении *n*-нонана на катализаторе увеличивается показатель октанового числа при увеличении суммарного содержания ароматических углеводородов с ростом температуры. Октановое число растет с ростом температуры на обеих каталитических системах: на чистом цеолите с 68 до 69 пунктов, на катализаторе с промотирующей добавкой с 77 до 81 по моторному методу и с 107 до 111 пунктов по исследовательскому методу.

С ростом температуры выход ароматических соединений меняется незначительно (в интервале 5%) и достигает максимального значения при 600°C 23.6 и 21.7% для промотированной и непромотированной системы соответственно (рис. 2).

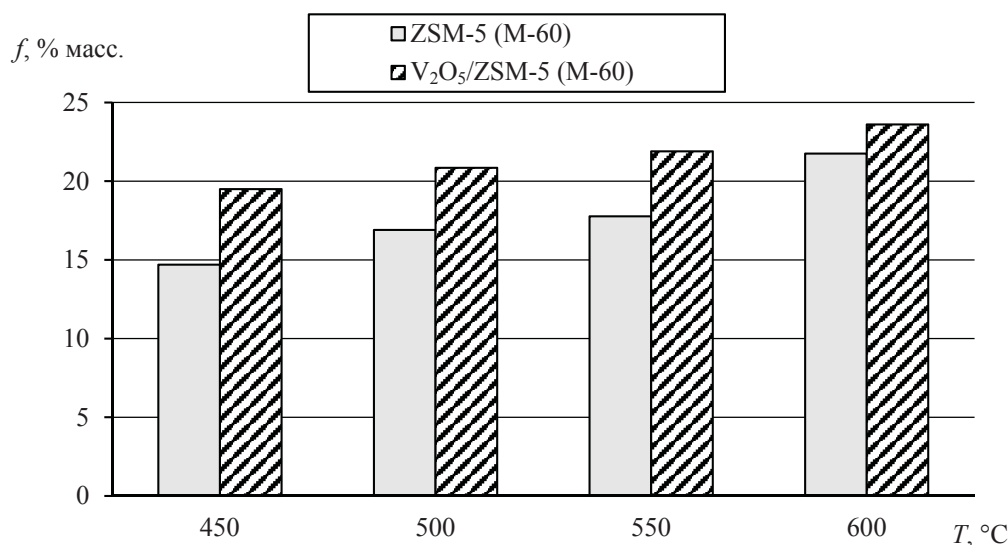


Рис. 2. Зависимость выхода ароматических углеводородов от температуры процесса

Немаловажным является оценка результатов экспериментальных данных с точки зрения содержания бензола, так как содержание данного компонента жестко регламентируется стандартами ЕВРО, с одной стороны, а с другой – бензол является ценным сырьем заводов нефтехимического профиля. Содержание бензола в результате превращения н-нонана в двух сериях опыта увеличивается с ростом температуры. Максимальное содержание бензола отмечено при 600°C для двух серий опытов.

Оценка данных материального баланса позволяет говорить, что температура осуществления процесса не влияет на выход газообразных и жидких продуктов в интервале температур 450–600°C.

Проведенные исследования показали, что введение модифицирующей добавки позволяет получать ценные газообразные продукты: бутан-бутиленовую и пропан-пропиленовую фракции, сухой газ (фракцию C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), используемый в качестве топлива для нужд НПЗ, и жидкие продукты, которые могут быть использованы в качестве компонентов моторных топлив с высоким октановым числом, а также в качестве сырья предприятий нефтехимического профиля.

Таким образом, в результате систематических исследований двух каталитических систем показано, что с ростом температуры увеличиваются конверсия н-нонана, выход продуктов реакций крекинга и ароматизации и значение октанового числа.

#### Список литературы

1. Аниськова Т. В., Федотов А. И., Кузьмина Р. И. Термодинамический анализ реакций изомеризации

превращения н-гексана на цеолитных системах ZSM-5, Cr-Bi-ZSM-5 // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 4. С. 399–403.

- Кузьмина Р. И., Аниськова Т. В., Пилипенко А. Ю., Степанов М. Ю. Влияние параметров активации висмутхромцеолитной системы на превращения н-гексана // Бутлеровские сообщения. 2013. № 4. С. 65–68.
- Герзелиев И. М., Арсланов Р. М., Капустин В. М., Бондаренко Г. Н. Каталитический крекинг гидроочищенного вакуумного газойля на цеолитсодержащем катализаторе, модифицированном наночастицами никеля и кобальта // Нефтехимия. 2016. Т. 56, № 13. С. 59–63.
- Хе Л., Зенг Ш., Рен Ш., Ю Х., Зенг Я. Новый катализатор крекинга для получения максимального выхода бензина // Нефтехимия. 2016. Т. 57, № 1. С. 62–67.
- Лиу Ж. Л., Ванг И. Д., Жанг Р., Лиу Х.И., Лиу З. С., Менг К. Х. Глубокий каталитический крекинг модельных соединений различных классов легких углеводородов на мезопористом катализаторе на основе цеолита // Нефтехимия. 2016. Т. 57, № 2. С. 149–155.
- Алтынкович Е. О., Потапенко О. В., Сорокина Т. П., Доронин В. П., Гуляева Т. И., Талзи В. П. Крекинг бутан-бутиленовой фракции на модифицированном цеолите ZSM-5 // Нефтехимия. 2016. Т. 57, № 2. С. 156–162.
- Кузьмина Р. И., Игнатъев С. В., Пилипенко А. Ю., Рыбкин Я. А. Кинетическое моделирование превращений углеводородов на высококремнистой цеолитной системе Ga-ZSM-5 // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 40, № 11. С. 72–83.
- Химия цеолитов и катализ на цеолитах : в 2 т. / под ред. Дж. Рабо. М. : Мир, 1980. Т. 1. 506 с. ; Т. 2. 422 с.
- Брек Д. Цеолитовые молекулярные сита. М. : Мир, 1976. 781 с.
- Миначев Х. М., Кондратьев Д. А. Свойства и применение в катализе цеолитов типа пентасил // Успехи химии. 1983. Т. 52, № 12. С. 1921–1973.



**The Transformation of n-nonane in Conditions of Catalytic Cracking on ZSM-5 and V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ZSM-5 Catalysts**

**K. A. Osipova, D. S. Senatov,  
V. A. Ohrimenko, T. V. Aniskova**

Kristina A. Osipova, ORCID 0000-0001-6865-7111, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, osipovaka18@mail.ru

Dmitriy S. Senatov, ORCID 0000-0001-7945-2365, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, senatovds@yandex.ru

Vadim A. Ohrimenko, ORCID 0000-0002-5781-2494, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, vadim.ohrimenko1@gmail.com

Tatyana V. Aniskova, ORCID 0000-0003-1988-323X, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, aniskovatv@mail.ru

The daily increasing demand for high-quality motor fuels requires constant improvement and modernization of existing technologies for oil refining. One of the main secondary processes of recycling hydrocarbon raw materials in industry, which allows to obtain high-octane components of automobile gasoline, valuable liquefied gases and raw materials for petrochemical industries is catalytic cracking of various types of distillate and residual raw materials. Nowadays, most catalysts of an industrial catalytic cracking contain expensive rare earth elements and platinum in its composition. Therefore, the development of lower-cost, highly active and stable catalytic systems for the conversion of n-hydrocarbons is an urgent task. In this regard, the aim of this work was to study the catalytic system based on zeolite ZSM-5 (M=60), promoted by vanadium pentoxide, and to assess the impact of the modifying additive V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> on the transformation of n-nonane. The study was carried out on a laboratory installation with a flow-through type reactor with a stationary catalyst bed. N-hexane was used as the raw material. The analysis of the conversion of n-nonane indicates that the introduction of a modifying additive allows the production of valuable gaseous products and liquid products with a high octane number that can be used as components of motor fuels.

**Key words:** catalytic cracking, catalysts, conversion of n-nonane, gasoline, zeolite.

**Образец для цитирования:**

Осипова К. А., Сенатов Д. С., Охрименко В. А., Аниськова Т. В. Превращение n-нонана в условиях каталитического крекинга на катализаторах ZSM-5 и V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ZSM-5 // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 252–255. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-252-255

**Cite this article as:**

Osipova K. A., Senatov D. S., Ohrimenko V. A., Aniskova T. V. The Transformation of n-nonane in Conditions of Catalytic Cracking on ZSM-5 and V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ZSM-5 Catalysts. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 252–255 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-252-255



УДК 543.054

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТВОРОВ КВЕРЦЕТИНА И РУТИНА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ

И. С. Решетникова, А. С. Романевич, С. Н. Штыков



Решетникова Ирина Сергеевна, аспирант кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, lrkasar@ya.ru

Романевич Анна Станиславовна, бакалавр кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, romanevichhhh@mail.ru

Штыков Сергей Николаевич, доктор химических наук, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, shtykovsn@mail.ru

Спектрофотометрическим методом изучено влияние pH и времени на изменение спектров поглощения молекулярной и диссоциированной по первой гидроксигруппе форм двух флавоноидов – кверцетина и рутина. Показано, что молекулярная форма кверцетина (pH 3–6) устойчива в водном растворе в течение 10 мин, а оптическая плотность диссоциированной формы (pH 8–10) в зависимости от pH быстро уменьшается уже в первые минуты. Интенсивность поглощения света молекулярной и диссоциированной форм рутина практически не изменяется на протяжении 10–20 минут. Установлено, что добавление в раствор сульфата натрия позволяет предотвратить окисление и стабилизировать оптическую плотность кверцетина в первые 1–2 минуты, что позволит изучать его протолитические свойства и взаимодействие с другими веществами.

**Ключевые слова:** кверцетин, рутин, спектры поглощения, протолитическое равновесие, устойчивость в растворе.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-256-260

### Введение

Кверцетин (3',4',5,7-пентагидроксифлавонон) (КВ) и его гликозид рутин (3-О-рутинозид) (РУ) являются одними из наиболее распространенных соединений растительного происхождения, обладающих разнообразными лечебными свойствами и высокой антиоксидантной активностью [1–3]. Оба соединения также используются в качестве аналитических реагентов на ряд металлов [4]. В связи с этим двум указанным флавоноидам посвящены тысячи публикаций [3]. Анализ литературных данных по кверцетину показал, что константы диссоциации его гидроксигрупп сильно различаются [5–13]. Основная причина, по мнению авторов [5, 6, 8], состоит во влиянии рас-

творенного в воде кислорода, который окисляет кверцетин. Следовательно, этот факт необходимо учитывать как при определении рК флавоноидов, их количественном определении в растительных и пищевых объектах и применении в качестве аналитических реагентов.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в спектрофотометрическом изучении изменения во времени кислотно-основных форм кверцетина и рутина и разработке способа их стабилизации в водном растворе.

### Экспериментальная часть

Использовали кверцетин дигидрат «Alfa Aesar», CAS 6151-25-3, 97% (Германия); рутин тригидрат «AlfaAesar», 97%, CAS 153-18-4 (Германия). Исходные растворы флавоноидов с концентрацией  $2 \times 10^{-4}$  моль/л готовили растворением точной навески препарата в 99% этаноле. Сульфит натрия, чда «Химмед» (Россия). Кислотно-основные свойства кверцетина и рутина изучали в диапазоне pH 3.0 – 11.0, используя ацетатно-аммиачные буферные (ААБ) растворы, приготовленные из исходных 2 М растворов аммиака и уксусной кислоты. Значения pH контролировали с помощью стеклянного электрода ЭСК-10601 на pH-метре pH-150 МИ (Гомель, Беларусь). Электронные спектры флавоноидов регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония).

### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены общая формула флавоноидов (1, а), формулы кверцетина (1, б) и рутина (1, в). Двум хромофорным центрам в спектре поглощения флавоноидов соответствуют две полосы поглощения: одна на границе УФ и видимой области в интервале 300–380 нм, которая связана с поглощением света частью молекулы под номером I, другая в УФ-области в интервале 340–280 нм, соответствующая поглощению света кольцом под номером II [14]. Наиболее чувствительной к условиям среды и химическому взаимодействию является полоса, отвечающая части I, изменение спектров которой использовалось для интерпретации процессов, протекающих в растворах.

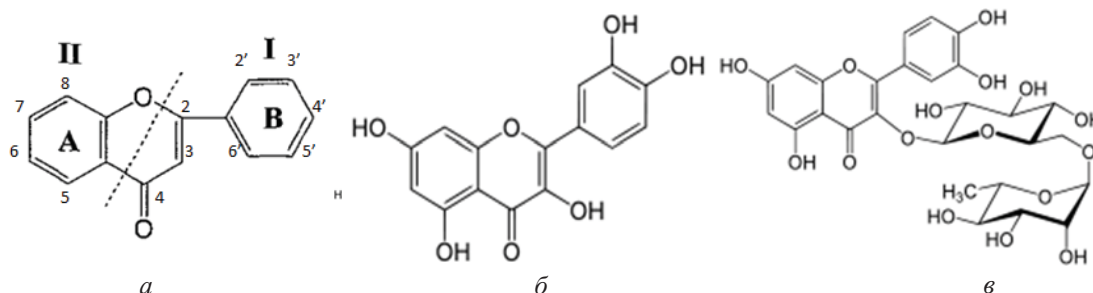


Рис. 1. Принципиальная структура флавоноидов (а), структурная формула кверцетина (б) и рутина (в)

**Влияние времени и pH на спектры поглощения кверцетина**

В соответствии с [5]  $pK_1$  и  $pK_2$  кверцетина равны  $6.62 \pm 0.04$  и  $9.7 \pm 0.3$ . В связи с этим в исследованном интервале pH 3–11 мы оценивали изменение во времени молекулярной и анионных форм флавоноидов. Примеры

спектров поглощения кверцетина при pH, соответствующих молекулярной (pH 3–6) и диссоциированной по одной из OH-групп форм реагента, представлены на рис. 2, а изменение оптической плотности в максимумах спектров указанных форм в течение 30 минут – на рис. 3.

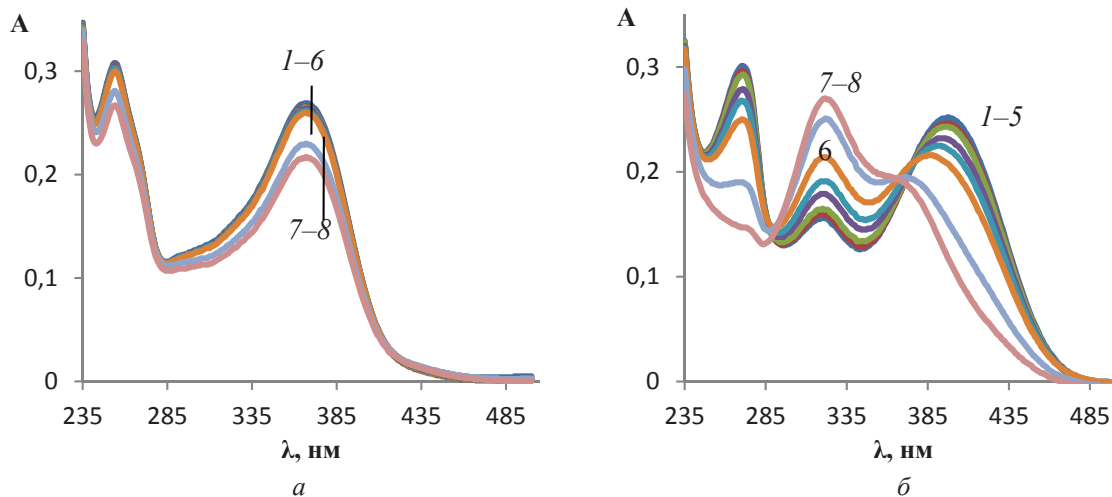


Рис. 2. Влияние времени на спектр поглощения кверцетина  $C_{KB} = 1 \cdot 10^{-5}$  М при pH: а – 5; б – 9; t, мин: 1 – 0.2; 2 – 0.5; 3 – 1; 4 – 3; 5 – 5; 6 – 10; 7 – 20; 8 – 30

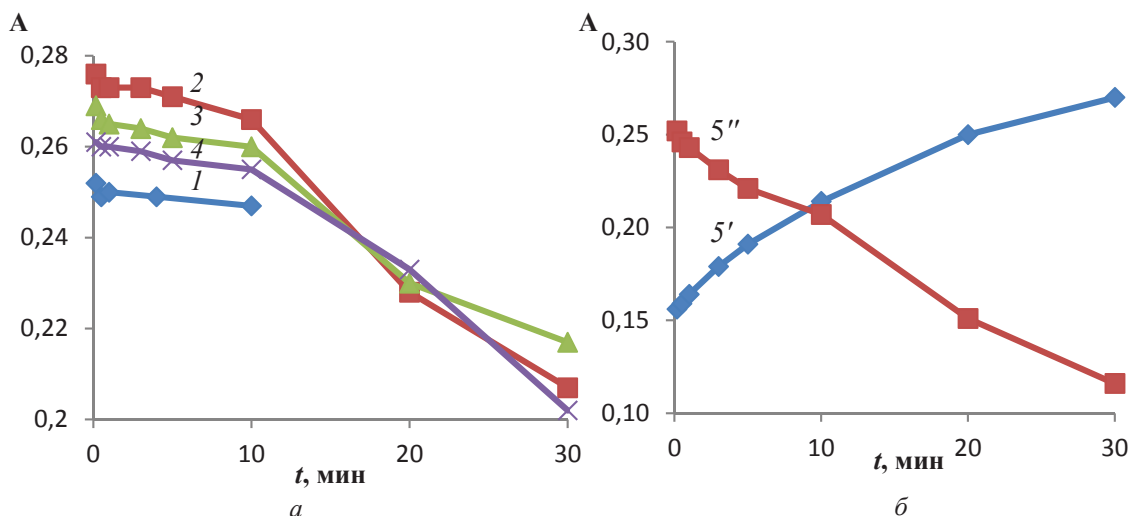


Рис. 3. Изменение оптической плотности кверцетина от времени,  $C_{KB} = 1 \cdot 10^{-5}$  М при pH: а – 3–6 при  $\lambda = 367$  нм и б – 9 при  $\lambda = 398$  нм и  $\lambda = 321$  нм; pH: (1) 3, (2) 4, (3) 5, (4) 6, (5') 9,  $\lambda = 321$  нм; (5'') 9,  $\lambda = 398$  нм



Из рис. 2, *а* видно, что форма спектра поглощения молекулярной формы со временем не изменяется. В первые 10 мин уменьшение оптической плотности не превышает 2–3%, т.е. незначительно. В последующие 20 мин оптическая плотность уменьшается примерно на 15% (рис. 3, *а*). Таким образом, можно заключить, что исследования в интервале рН 3–6 необходимо проводить в первые 10 мин после приготовления раствора.

Радикальное изменение спектра, соответствующего однократно диссоциированной форме кверцетина, происходит при рН 9 и в более щелочной области. Из рис. 2, *б* следует, что вследствие предполагаемого окисления полосы диссоциированной формы с максимумами при 398 и 270 нм исчезают и одновременно появляется новая сложная полоса с максимумом при 320 и плечом при 370 нм. Уменьшение оптической плотности при 398 нм и одновременный рост оптической плотности при 321 нм показаны на рис. 3, *б*. Видно, что в течение первых 5 мин оптическая плотность при  $\lambda = 398$  нм уменьшается на 12%, а за 30 мин оптическая плотность исходной формы

уменьшается вдвое и полоса диссоциированной формы практически исчезает. Еще более быстро уменьшение оптической плотности диссоциированной формы происходит при рН 10 и 11. Следует отметить, что в спектрах поглощения кверцетина при его окислении в растворе наблюдаются две изобестические точки (рис. 2, *б*) при 288 и 368 нм, свидетельствующие о равновесии между однократно диссоциированной и окисленной формами флавоноида.

#### **Влияние времени и рН на спектры поглощения рутина**

Спектры поглощения на примере молекулярной (рН 3–7) и однократно диссоциированной формы (рН 9) рутина представлены на рис. 4. Видно, что в обоих случаях даже на протяжении 30 мин форма спектров практически не меняется, а изменения оптической плотности в максимумах обеих форм рутина незначительны и не превышают 5–10%. Это позволяет предположить, что окисление кверцетина происходит по гидроксильной группе в положении 3, которая в рутине отсутствует.

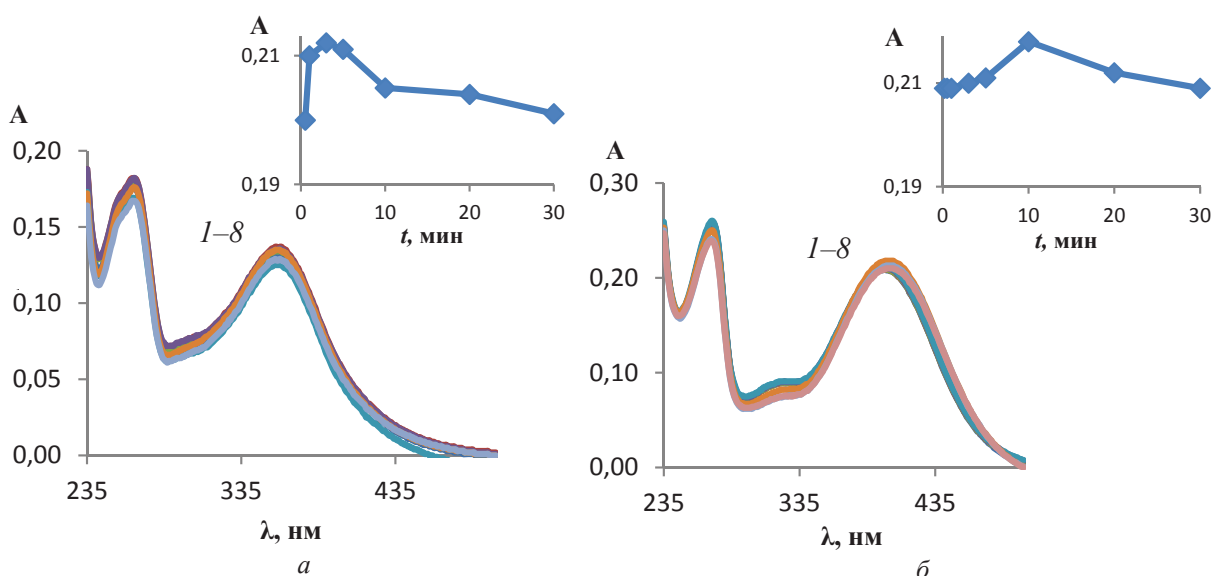


Рис. 4. Влияние времени на спектры поглощения рутина и изменение оптической плотности от времени при рН: *а* –  $\lambda = 354$  нм и *б* –  $\lambda = 398$  нм.  $C_{ру} = 1 \cdot 10^{-5}$  М. *t*, мин: (1) 0.2; (2) 0.5; (3) 1; (4) 3; (5) 5; (6) 10; (7) 20; (8) 30

#### **Влияние сульфита натрия на устойчивость растворов кверцетина**

Если предположить, что резкие изменения спектров диссоциированной формы кверцетина связаны с окислением растворенным в воде кислородом воздуха, концентрация которого составляет  $9,1 \text{ мг/дм}^3$  ( $2,8 \cdot 10^{-4}$  М), то добавлением в раствор восстановителей можно будет временно удалить кислород и получить спектр истинной диссоциированной формы кверцетина. В связи с

этим нами изучено влияние добавок сульфита натрия на форму спектров и оптическую плотность кверцетина в щелочной среде (рис. 5).

Из рис. 5 видно, что добавление сульфита натрия стабилизирует оптическую плотность диссоциированной формы кверцетина при 408 нм, по крайней мере, в течение 1–2 мин. Даже через 10 мин в спектре поглощения сохраняется полоса диссоциированной формы кверцетина (кривая 12). Таким образом, вместо пропускания через



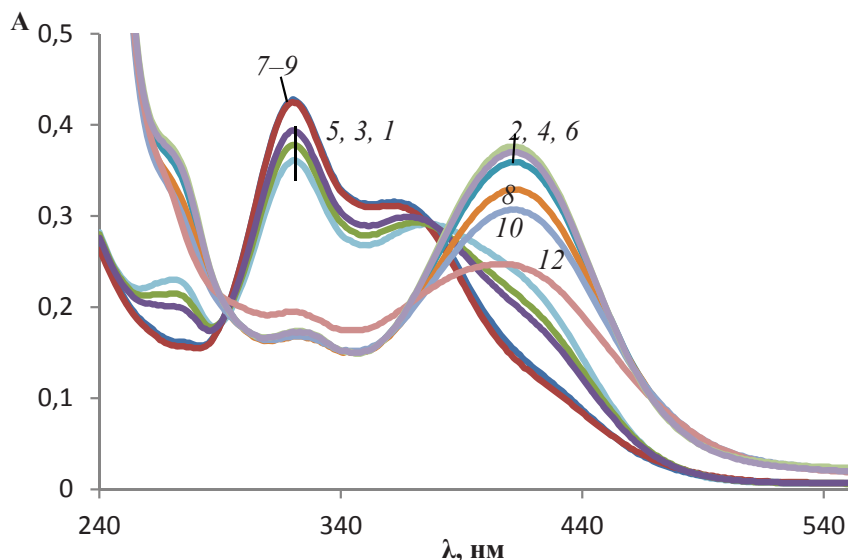


Рис. 5. Спектры поглощения кверцетина в присутствии (2, 4, 6, 8, 10, 12) и без добавления (1, 3, 5, 7, 9, 11)  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , pH 10. ААБ.  $C_{\text{КВ}} = 2 \cdot 10^{-5}$  М.  $C_{\text{Na}_2\text{SO}_3} = 10^{-2}$  М.  $t$ , мин: (1, 2) 0,2; (3, 4) 0,5; (5, 6) 1; (7, 8) 3; (9, 10) 5; (11, 12) 10

раствор азота, рекомендованного в работе [5], который из-за образования пены может мешать определению констант диссоциации кверцетина в присутствии поверхностно-активных веществ, нами предлагается использовать сульфит натрия.

### Заключение

Изучение влияния времени и pH на поведение в растворе кверцетина и рутина позволило установить, что их устойчивость определяется тремя факторами: природой реагента, кислотностью среды и присутствием в воде растворенного кислорода. Оптическая плотность спектров поглощения кверцетина в интервале pH 3–6 (молекулярная форма) в течение первых 10 мин уменьшается не более чем на 2–3%, а в течение 30 мин на 15%. При pH 9–11 устойчивость кверцетина в водном растворе резко уменьшается: оптическая плотность раствора падает на 12–15% в первые 5 мин и более чем на 50% в течение 30 мин. При этом вместо двух полос, соответствующих однократно диссоциированной ионной форме, появляется новая полоса, принадлежащая, по-видимому, окисленной форме реагента. Показано, что добавление в водный раствор сульфита натрия позволяет стабилизировать диссоциированную ионную форму кверцетина при pH 9–10 в течение 1–2 мин. Спектры рутина во всем интервале pH не изменяют своей формы, а оптическая плотность за 30 мин уменьшается не более чем на 5–10%.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-03-01029).

### Список литературы

1. Корупкин Д. Ю., Абилов Ж. А., Музыкалина Р. А., Толстиков Г. А. Природные флавоноиды. Новосибирск : Тео, 2007. 232 с.
2. Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдрасилов Б. С., Музафаров Е. Н. Флавоноиды : биохимия, биофизика, медицина. Пушино : Synchronbook, 2013. 310 с.
3. Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. Природные фенольные антиоксиданты в биоаналитической химии : состояние проблемы и перспективы развития // Успехи химии. 2015. Т. 84, № 2. С. 194–224.
4. Марченко З., Бальцержак М. Методы спектрофотометрии в УФ и видимой областях в неорганическом анализе. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 711 с.
5. Зенкевич И. Г., Гущина С. В. Определение констант диссоциации соединений, окисляющихся кислородом воздуха в водных растворах (на примере кверцетина) // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65, № 4. С. 382–387.
6. Zenkevich I. G., Eshchenko A. Yu., Makarova S. V., Vitenberg A. G., Dobryakov Yu. G., Utsal V. A. Identification of the Products of Oxidation of Quercetin by Air Oxygen at Ambient Temperature // *Molecules*. 2007. Vol. 12. P. 654–672.
7. Mezzetti A., Protti S., Lapouge Ch., Cornard J-P. Protic equilibria as the key factor of quercetin emission in solution. Relevance to biochemical and analytical studies // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. Vol. 13. P. 6858–6864.
8. Álvarez-Diduk R., Ramirez-Silva M. T., Galano A., Merkoçi A. Deprotonation Mechanism and Acidity Constants in Aqueous Solution of Flavonols : a Combined Experimental and Theoretical Study // *J. Phys. Chem. B*. 2013. Vol. 117, № 41. P. 12347–12359.



9. Барвиченко Н. А., Липковская Н. А., Федянина Т. В. Кето-енольная таутомерия кверцетина в растворах катионного ПАВ мирамистина // Коллоид. журн. 2014. Т. 76, № 1. С. 3–7.
10. Kuntic V., Pejic N., Micic S., Malesev D., Vujic Z. Determination of Dissociation Constants of Quercetin // Pharmazie. 2003. Vol. 58. P. 439–440.
11. Herrero-Martinez J. M., Repolles C., Bosch E., Roses M., Rafols C. Potentiometric Determination of Aqueous Dissociation Constants of Flavonols Sparingly Soluble in Water // Talanta. 2008. Vol. 74. P. 1008–1013.
12. Herrero Martinez J. M., Sanmartin M., Roses M., Bosch E., Rafols C. Determination of Dissociation Constants of Flavonoids by Capillary Electrophoresis // Electrophoresis. 2005. Vol. 28. P. 1886–1895.
13. Topolewski P., Zommer-Urbańska S. Spectrophotometric investigation of protolytic equilibria of rutin // Microchim. Acta. 1989. Vol. 97, № 1–2. P. 75–80.
14. Naseem B., Shah S. W. H., Hasan A., Shah S. S. Interaction of flavonoids, the naturally occurring antioxidants with different media : A UV–visible spectroscopic study // Spectrochim. Acta. Part A. 2010. Vol. 75. P. 1341–1346.

### Spectrophotometric Study of the Stability the Quercetin and Rutin Solutions at Different Acidity of the Medium

I. S. Reshetnikova, A. S. Romanevich, S. N. Shtykov

Irina S. Reshetnikova, ORCID 0000-0002-1240-5991, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, lrkasar@ya.ru

Anna S. Romanevich, ORCID 0000-0001-7534-9408, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, romanevichhhh@mail.ru

Sergei N. Shtykov, ORCID 0000-0001-6753-5040, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, shtykovsn@mail.ru

Flavonoids are a group of polyphenolic compounds present in many plants, fruits, vegetables, nuts, flowers etc. They exhibit a wide range of bioactivity and have gained much attraction last two decades because of its potential applications in biology, medicine, and chemical analysis due to their antioxidant, medicinal (antiviral, antibacterial, antiallergic effects) and complexation properties. One of the main properties of flavonoids especially quercetin is their oxidation by oxygen dissolved in water or organic solvents mainly in basic media. This is the main reason for non-reproducibility of quercetin acidity constants determined by several authors. Hence, the aim of our paper was to investigate the pH and time effects on the behavior of quercetin and rutin aqua solutions and to find possibility for stabilization of their solutions. It was established that their stability in solution is determined by three factors: the nature of flavonoids, acidity of the medium (created by acetate-ammonium buffers) and presence of oxygen in solution. It was found that quercetin solutions in the pH interval 3–6 are stable during first ten minutes but at the end of thirty minutes the optical density falls down about 15 percent. In basic media, especially at pH 9–11, the optical density of quercetin falls down at first 1–2 minutes and after 10 minutes the quercetin spectra transform their shape and maximum position that belong to oxidized form of the flavonoid. We found that addition of 0.01 M of sodium sulfite prevents oxidation and stabilizes optical density of quercetin at pH 9–10 during 1–2 minutes; therefore, it is possible to investigate the protolytic reactions and interaction with different substances. The rutin spectra are not significantly change in acidic and basic media during first ten minutes and during next twenty minutes the optical density in the basic media decreases by 15 percent.

**Keywords:** quercetin, rutin, absorption spectra, protolytic equilibrium, stability in solution.

*Acknowledgements:* This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-03-01029a).

### Образец для цитирования:

Решетникова И. С., Романевич А. С., Штыков С. Н. Спектрофотометрическое изучение устойчивости растворов кверцетина и рутина при различной кислотности среды // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 256–260. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-256-260

### Cite this article as:

Reshetnikova I. S., Romanevich A. S., Shtykov S. N. Spectrophotometric Study of the Stability the Quercetin and Rutin Solutions at Different Acidity of the Medium. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 256–260 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-256-260



УДК 543.25

## СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ $\alpha$ -АМИНОКИСЛОТ (ОБЗОР)

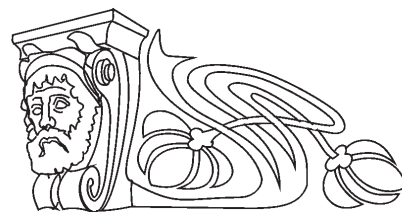
О. В. Варыгина, Е. И. Селифонова, Р. К. Чернова

Варыгина Ольга Владимировна, инженер кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, E-mail: varigini@mail.ru

Селифонова Екатерина Игоревна, старший научный сотрудник Образовательно-научного института наноструктур и биосистем, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, slief-ei@yandex.ru

Чернова Римма Кузьминична, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, chernov-ia@yandex.ru.

Рассмотрены принципы создания ионоселективных электродов на  $\alpha$ -аминокислоты в исторической ретроспективе. Показано, что до последнего времени при создании потенциометрических мембранных сенсоров основной акцент был сделан на формирование более селективных датчиков, способных избирательно определять концентрацию отдельного аналита в многокомпонентных системах. Материалом для таких сенсоров являлись ионоселективные мембраны, которые создавались специфичными для конкретного аналита, но не были специфичными для всего класса таких аналитов. В этом плане обобщены характеристики сенсоров, селективных к  $\alpha$ -аминокислотам, разработанных на основе стеклянных, обратимых по однозарядным катионам электродов, путем нанесения на них тонкого слоя фермента. Ферменты (оксидаза, аспарагиназа и др.) катализируют разложение соответствующих аминокислот. Выделяющиеся газы определяются электродом, потенциал которого пропорционален концентрации аминокислоты. Новый этап в развитии сенсоров начался с открытия подандов (открытопочечных ионофоров с высокоосновными концевыми группами, краунэфиров, каликс [7]аренов и т.п.) примененных для создания сенсоров на гидрохлориды эфиров аминокислот. Обсужден механизм образования ионофоров, тип связи, аналитические характеристики сенсоров. Рассмотрен цикл работ по созданию сенсоров, основанных на регистрации потенциала Доннана на границе ионообменный полимер/исследуемый раствор. Показано, что наномодификация поверхности перфторированного сульфокатионитового полимера (поверхности мембраны) увеличивает чувствительность сенсора. Описаны пьезокварцевые резонаторы, сенсоры, основанные на цифровой регистрации эффектов набухания и контракции набора гранул сорбентов, хиральные аминокислотные электроды. Отмечено формирование в настоящее время нового направления в создании сенсоров на  $\alpha$ -аминокислоты – потенциометрических мультисенсорных систем на основе ионообменных комбинированных мембран, аналитическим сигналом в которых является потенциал Доннана. Показаны возможности направленного варьирования химических свойств ПД-сенсоров с помощью модификации пер-



фторированных сульфокатионообменных мембран. Оценены перекрестная чувствительность в многокомпонентных средах и воспроизводимость аналитических характеристик в мультисенсорных ПД-системах.

**Ключевые слова:** ионоселективные электроды,  $\alpha$ -аминокислоты, ионный ассоциат, ионофор.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-261-267

Под химическим сенсором обычно понимают устройство, избирательно реагирующее на соответствующий аналит путем химической реакции. Каждый химический сенсор включает в себя чувствительный элемент, в котором происходит химическая реакция, результатом которой и является аналитический сигнал (изменение электродного потенциала, оптической плотности, pH и др.), а также преобразователь химической энергии, «откликающийся» на этот сигнал и преобразующий его величину в данные о количестве определяемого аналита. По типу преобразователя все химические сенсоры подразделяют на электрохимические (потенциометрические, вольтамперметрические, полупроводниковые), оптические, масс-чувствительные и колориметрические [1].

В настоящей работе рассмотрены потенциометрические сенсоры для определения ряда  $\alpha$ -аминокислот. Преимущества потенциометрических сенсоров, применяемых в анализе пищевых продуктов, технологических сред, физиологических жидкостей, природных объектов, связаны с их избирательностью, широким диапазоном определяемых концентраций, экспрессностью определений и простотой аппаратного оформления.

Проблема разработки сенсоров для определения различных биологически активных веществ ( $\alpha$ -аминокислот, витаминов, лекарственных веществ) остается актуальной. Трудность определения в водных растворах связана с амфотерными свойствами, вследствие чего концентрации их ионных и цвиттерионных форм зависит как от величины pH раствора, так и от присутствия других электролитов.

В таблице обобщены сведения о типах сенсоров, применяемых для определения  $\alpha$ -аминокислот.

Сенсоры на  $\alpha$ -аминокислоты

№	Тип сенсора	Основные реакции и принцип действия	Определяемая аминокислота	Литература
1	Модифицированные стеклянные обратимые по катиону (однозарядному) электроды с нанесенным тонким слоем фермента	Фермент катализирует разложение $\alpha$ -аминокислоты $2R\text{CHNH}_3^+ \text{COO}^- + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{катализа}}$ $2\text{RCOCOO}^- + \text{NH}_4^+$	L- и D-аминокислоты (пролин, аланин, метионин, фенилаланин, лизин, лейцин и др.)	[1–13]
2	Электродно-активные вещества: антибиотик моненсин, каликсарены и др. поданды	Энантиомерная селективность к гидрохлоридам сложных эфиров $\alpha$ -аминокислот	Метионин, аланин, пролин, валин	[14–16]
3	ПД-сенсоры с мембраной, содержащей ионообменный полимер	Регистрация потенциала Доннана	Триптофан, аланин, валин, метионин, пролин, лизин	[17–20]
4	Пьезокварцевые резонаторы, модифицированные полимером с молекулярным отпечатком	Сдвиг частоты/резонатора сенсора в пробе по сравнению с холостым раствором	Глицин, фенилаланин	[21, 22]
5	Мультисенсорные системы с применением для обработки данных хемометрических алгоритмов	Цифровая регистрация эффектов набухания и контракции набора гранул сорбента	Аминокислоты	[23]
6	Хиральные аминокислотные электроды для определения L- и D-аминокислот	Комплексообразование хиральной фазы полимера с привитым оптически активным комплексом Cu (II) с L-пролином для разделения энантиомеров аминокислот	Разные $\alpha$ -аминокислоты	[24, 25]
7	Перекрестно-чувствительные ПД-сенсоры	Использованы гибридные материалы: перфторированные сульфокатионитные мембраны Nafion и МФ-4СК с наночастицами диоксидов циркония, кремния	Глицин, аланин, лейцин, лизин, цистеин	[26–30]
8	Пьезосенсоры, модифицированные полимерами с молекулярными отпечатками (ПМО-сенсоры)	Аналитический сигнал- потенциал Доннана на границе: полимер/ исследуемый раствор	Валин, аминокислоты в разных формах и неорганические ионы	[31]
9	Потенциометрическая мультисенсорная система	Массив сенсоров: перекрестно- чувствительный сенсор, набор ионселективных электродов; аналитический сигнал – потенциал Доннана	Лизин (в присутствии $\text{K}^+$ , $\text{Na}^+$ )	[32]
10	Потенциометрические перекрестно-чувствительные сенсоры на основе перфторированных сульфокатионообменных мембран	Потенциал Доннана в щелочных растворах серосодержащей аминокислоты	Совместное определение цвиттерионов аминокислот, $\text{K}^+$ в щелочных средах	[33]
11	ПД-сенсоры на основе мембран Nafion с наночастицами диоксида циркония	Направленное изменение параметров ПД-сенсоров с помощью термообработки и механической деформации мембран	Аминокислоты с несколькими азотсодержащими группами	[34]
12	ПД-сенсоры на основе гибридных мембран МФ-4СК с наночастицами оксида кремния и гидрофобной поверхностью	Направленное изменение ионной проводимости, диффузионной проницаемости, стабильности отклика и чувствительности ПД-сенсоров	Катионы фенилаланина, валина, метионина	[35]
13	Автоматизация хронопотенциометрических измерений отклика массива ПД-сенсоров	Предложен новый программно-аппаратный комплекс	Катионы лизина в растворах солей $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$	[36]
14	Потенциометрические датчики на основе перфторированных мембран с наночастицами кремнезема и поверхностью, модифицированной протоноакцепторными группами	Оценена возможность одновременного определения анионов аминокислот и $\text{K}^+$ при pH 4 – 9 в интервале концентраций от $1,0 \cdot 10^{-4}$ до $1,0 \cdot 10^{-2}$ м, погрешность определения < 14%	Одновременное определение анионов аспарагиновой, глутаминовой аминокислот и катионов калия	[37]



Окончание таблицы

№	Тип сенсора	Основные реакции и принцип действия	Определяемая аминокислота	Литература
15	Новые потенциометрические ПД-сенсоры для определения аминокислот, витаминов и лекарственных веществ в водных растворах	Выбраны оптимальные мембранные композиции для массивов кросс-чувствительных датчиков, разработанный сенсор включен в массив мультисенсорных систем для определения гидрохлоридов лизина тиамина, новокаина, лидокаина, $K^+$ , $Na^+$ , погрешность определения не превышает 10%	Лизин в присутствии $K^+$ , $Na^+$ , местных анестетиков	[38, 39]
16	Потенциометрические перекрестно-чувствительные ПД-сенсоры на основе гибридных мембран с $ZrO_2$	Получены перекрестно чувствительные сенсоры для создания мультисенсорной системы, проведена хемотрическая обработка полученных данных	Определение глицина, аланина, лейцина, $K^+$	[40, 41]

Принцип построения ионоселективных электродов (ИСЭ) для определения  $\alpha$ -аминокислот стал активно обсуждаться в литературе в 70-х гг. прошлого столетия. Селективные к  $\alpha$ -аминокислотам электроды разрабатывались на основе стеклянных, обратимых по катионам электродов чувствительных к однозарядным катионам, путем нанесения на них тонкого слоя фермента [2]. При этом соответствующие ферменты (оксидаза, аспарагиназа, глутаминаза и т.д.) катализируют разложение аминокислот с образованием, например  $NH_4^+$  [см. таблицу, № 1]. Образовавшиеся ионы аммония определяются электродом, потенциал которого пропорционален активности ионов  $NH_4^+$  в ферментном слое, следовательно, концентрации аминокислоты в пробе. Это были первые примеры «биосенсоров», поскольку в них использовались биохимические процессы, которые включали катализируемые ферментами реакции с аналитом для получения продуктов, регистрируемых модифицированными стеклянными электродами, обратимыми по однозарядному катиону [3–6]. В этих работах обсуждалась техника иммобилизации ферментов, возможность определения L- и D-аминокислот. Описан ряд других ферментных электродов на  $\alpha$ -аминокислоты на базе модифицированных коммерческих ионоселективных электродов (аммоний-селективного [7, 8], иодидного [9],  $CO_2$ -селективного [10–12],  $O_2$ -селективного [13]). Можно заключить, что рассмотренные ферментные электроды не получили широкого применения на практике и не легли в основу стандартов вследствие малой доступности ферментов и высокой стоимости электродов, малого времени их стабильной работы, в ряде случаев низкой чувствительности и селективности.

Новым направлением в создании сенсоров на  $\alpha$ -аминокислоты явилось установление в 90-х гг. XX в. того факта, что ациклический природный антибиотик полиэфирного типа монесин, кото-

рый содержит центры хиральности, в мембранах ионоселективных электродов обладает энантиомерной селективностью к оптически активным катионам – гидрохлоридам сложных эфиров аминокислот [14–16]. В результате началось более широкое исследование открытопочечных ионофоров – подандов, вследствие чего были открыты поданды с высокоосновными концевыми группами (фосфиноксидными) как активные компоненты мембран ИСЭ на эфиры  $\alpha$ -аминокислот. Впоследствии в качестве активных компонентов пластифицированных мембран ИСЭ нашли применение новые макроциклические соединения с большими чашеобразными полостями – каликс[n]арены. Взаимодействие в таких системах происходит по типу «гость – хозяин». Их применяют в мембранах ионоселективных электродов на гидрохлориды эфиров аминокислот.

Так, в работе [16] описан макрогетероциклический лиганд бензо-15-краун-5 в составе поливинилхлоридной матрицы как электродноактивное вещество на метиловый эфир L-триптофана в интервале концентраций 1 М – 0,0001 М в присутствии метиловых эфиров других L-аминокислот (аланина, валина, метионина, пролина). Электрод использован для селективного определения триптофана в различных биопробах. Отмечается также, что применение хиральных краун-эфиров в мембране позволяет измерить концентрации L- и D-энантиомеров метиловых эфиров аминокислот.

К новому типу сенсоров следует отнести сенсор, основанный на регистрации потенциала Доннана на границе ионообменный полимер / исследуемый раствор [17, 19]. В работах показано, что наномодификация поверхности перфторированного сульфокатионитового полимера, применяемого при изготовлении ИСЭ, существенно увеличивает чувствительность сенсора, который используют для определения лизина в водных растворах в присутствии нейтральных аминокислот



и предложен в качестве перекрестно чувствительного сенсора в массиве мультисенсорных систем для определения лизина в технологических растворах [20].

Известны работы по применению нового типа сенсоров – пьезокварцевых резонаторов для определения  $\alpha$ -аминокислот. Так, в работе [21, 22] представлена методика определения глицина в бинарных смесях с аланином и валином (водные среды) с пьезосенсором, модифицированным полимером с молекулярным отпечатком; рассмотрены вопросы синтеза модификатора, даны коэффициенты селективности и импринтинг-факторы. В работе [22] предложен пьезосенсор на базе пьезоэлектрических кварцевых резонаторов АТ-среза с серебряными электродами и частотой 4.6 МГц для определения фенилаланина в водных растворах и биологических жидкостях. Поверхность электродов модифицирована полимерами с молекулярными отпечатками фенилаланина. Определение аналита проводили, погружая пьезосенсор в пробу и раствор с холостой пробой, после получения аналитического сигнала сенсора вычисляли относительный сдвиг частоты  $f$ . Электрод селективен к фенилаланину, предел обнаружения 10–6 моль/л. Один сенсор позволяет произвести до 28 измерительных циклов.

Новая мультисенсорная система, основанная на цифровой регистрации эффектов набухания и контракции набора гранул сорбентов, исследована с применением хемометрических алгоритмов в работе [23]. Авторы данной работы показали, что объемные эффекты различных смол и сорбентов, взятых в виде сферических гранул, могут быть использованы в аналитических целях, в частности, для определения аминокислот.

Хиральные аминокислотные электроды разработаны для определения D-аланина [24]. В работе [25] описан амперометрический биосенсор для быстрого определения L- и D-аминокислот.

Как следует из вышеприведенных данных, до последних десятилетий минувшего столетия при исследовании потенциометрических мембранных сенсоров основные усилия были направлены на формирование более селективных датчиков, способных избирательно определять концентрацию одного из аналитов в многокомпонентных системах. Материалом для таких сенсоров являлись различные ионоселективные мембраны, обеспечивающие чувствительность к конкретному иону, но не являющиеся специфическими для данного типа ионов.

В конце XX в. сформировалось новое направление в создании потенциометрических сенсоров – мультисенсорные потенциометрические

системы. В 1990 г. был создан сенсор вкуса на основе липидных мембран, а в 1995 г. для мультисенсорных систем с набором низкоселективных потенциометрических сенсоров с перекрестной чувствительностью и использованием математических методов распознавания образов с целью качественного и количественного анализа многокомпонентных растворов различной природы был введен термин «электронный язык».

Преимуществом мультисенсорных потенциометрических систем, помимо учета влияния мешающих ионов на отклик сенсора, является прежде всего тот факт, что все параметры сенсоров определяются непосредственно в реальных многокомпонентных растворах. Уже в первых работах по применению массивов сенсоров было показано, что использование методов многомерной обработки данных для откликов сенсоров позволяет компенсировать недостаточную селективность ИСЭ и проводить определение ионов в многокомпонентных растворах. Помимо компенсации недостаточной селективности сенсоров, использование массивов сенсоров с перекрестной чувствительностью, т.е. с чувствительностью каждого сенсора ко всем (или некоторым) ионам в растворе, позволяет значительно понизить предел обнаружения и погрешности определения ионов. Возможность проводить потенциометрические измерения без электрода сравнения, измеряя разности потенциалов между всеми парами сенсоров в массиве, является одним из преимуществ мультисенсорных систем. Общие требования к характеристикам сенсоров в мультисенсорных системах – высокая перекрестная чувствительность в многокомпонентных средах и воспроизводимые аналитические характеристики. Отклик перекрестно чувствительного потенциометрического сенсора в многокомпонентном растворе содержит информацию о различных присутствующих компонентах. Для извлечения этой информации необходим совокупный анализ откликов всех сенсоров в массиве. Поэтому важен правильный выбор и применение адекватных методов обработки данных.

Мультисенсорный подход для анализа многокомпонентных сред может быть распространен на сенсоры с различным типом аналитического сигнала и природой взаимодействия с аналитом. Из таблицы следует, что основная тенденция в развитии сенсоров на  $\alpha$ -аминокислоты в последнее время также связана с созданием мультисенсорных систем и применением комбинированных мембран. В цикле работ ученых воронежской школы аналитиков обобщены данные по изучению сенсоров, аналитическим сигналом которых яв-



ляется потенциал Доннана (см. таблицу, № 7–40); рассмотрено применение в анализе многокомпонентных растворов мультисенсорных систем на основе ионообменных мембран для определения  $\alpha$ -аминокислот; приведены данные о наиболее перспективных мембранных наноматериалах в ПД-сенсорах; показаны также возможности направленного варьирования химических свойств ПД-сенсоров с помощью модификации перфторированных сульфокатионнообменных мембран различными подандами; показано, что повышение селективности мембран к катионам приводит к увеличению чувствительности сенсоров к катионам аминокислот и снижению чувствительности к мешающим ионам гидроксония. Важнейшим результатом является также то, что с помощью направленной модификации поверхности допандов удается получить высокую чувствительность сенсоров одновременно к катионам и анионам  $\alpha$ -аминокислот в щелочных средах.

Таким образом, сенсорные системы на основе ионоселективных электродов для определения аминокислот можно отнести к числу перспективных, современных методов анализа, сочетающих высокую селективность, экспрессность, чувствительность, простоту и достаточную точность определения.

### Список литературы

1. Катрлл Р. В. Химические сенсоры / пер. с англ. М.: Науч. мир, 2000. 143 с.
2. Байцлеску Г., Кошофреу В. Применение ион-селективных мембранных электродов в органическом анализе. М.: Мир, 1980. 231 с.
3. Guilbault G. G., Hrabankova E. An Electrode for determination of Amino Acids // *Anal. Chem.* 1970. № 42. P. 1779–1783.
4. Guilbault G. G., Hrabankova E. An L-amino acid electrode // *Anal. Lett.* 1970. № 3. P. 53–57.
5. Guilbault G. G., Hrabankova E. New enzyme electrode probes for d-amino acids and asparagine // *Anal. Chem. Acta.* 1971. № 56. P. 285–290.
6. Guilbault G. G., Shu F. R. An electrode for the determination of glutamine // *Anal. Chem.* 1971. № 56. P. 333–338.
7. Guilbault G. G., Nagy G. Enzyme electrodes for the determination of 1-phenylalanine // *Anal. Lett.* 1973. № 6. P. 301–312.
8. Ogoto K., Otteson M., Svendsen I. Preparation of water-insoluble, enzymatically active derivatives of subtilisin type Novo by cross-linking with glutaraldehyde // *Biochim. Biophys. Acta.* 1968. № 159. P. 403–405.
9. Guilbault G. G., Shu F. R. Enzyme Electrodes Based on the Use of a Carbon Dioxide Sensor. Urea and L-Tyrosine Electrodes // *Anal. Chem.* 1972. № 44. P. 2161–2165.
10. Stow R. W., Baer R. F., Randall B. F. Rapid measurement of the tension of carbon dioxide in blood // *Arch. Phys. Med.* 1957. № 38. P. 646–650.
11. Gambino S. R. Determination of Blood pCO<sub>2</sub> // *Clin. Chem.* 1961. Vol. 7, № 4. P. 236–242.
12. Calvot C., Bejonneau A. -M., Gell G., Thomas D. Magnetic enzyme membranes as active elements of electrochemical sensors. specific amino acid enzyme electrodes // *FEBS Lett.* 1975. № 59. P. 258.
13. Nanjo M., Guilbault G. G. Enzyme electrode for L-amino acids and glucose // *Anal. Chem. Acta.* 1973. № 73. P. 367–370.
14. Шведене Н. В. Селективные электроды на органические ионы // *Сорос. образоват. журн.* 2004. Т. 8, № 2. С. 37–43.
15. Leyzerovich N. N., Shvedene N. V., Blikova Yu. N. Comparative study of metall-phthalocyanates as active component in sal-selective electrodes // *Electroanalysis.* 2001. Vol. 13, № 3. P. 246–252.
16. Тимова Н. Ю. Потенциометрический биосенсор для анализа содержания метилового эфира L-триптофана // *Аналитические приборы : тез. докл. III Всерос. конф. СПб., 2008.* С. 115.
17. Агупова М. В., Паришина А. В., Бобрешова О. В., Кулинцов П. И. Новый способ определения доннановского потенциала в электромембранных процессах // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2008. Т. 8, вып. 2. С. 241–245.
18. Бобрешова О. В. Новые потенциометрические сенсоры для определения аминокислот, витаминов и лекарственных веществ в водных растворах // *Аналитическая химия – новые методы и возможности : материалы съезда аналитиков России, 26–30 апреля 2010 г. М., 2010.* С. 45–46.
19. Агупова М. В., Паришина А. В., Бобрешова О. В. Потенциометрическое определение лизина моногидрохлорида в индивидуальных и смешанных водных растворах // *Аналитическая химия – новые методы и возможности : материалы Съезда аналитиков России, 26–30 апреля 2010 г. М., 2010.* С. 22.
20. Бобрешова О. В., Паришина А. В., Тимофеев С. В., Полуместная К. А. Пат. 87260 РФ. № 2009115481; заявл. 23.04.2009; опубл. 27.09.2009; бюл. № 27.
21. Зяблов А. Н., Калач А. В., Жиброва Ю. А., Селеменов В. Ф., Дьяконова О. В. Определение глицина в водных растворах пьезосенсором, модифицированным полимером с молекулярным отпечатком // *Журн. аналит. химии.* 2010. Т. 65, № 1. С. 93–95.
22. Никитская Л. М., Никитский А. С., Зяблов А. Н., Калач А. В., Селеменов В. Ф. Определение фенилаланина в биологических жидкостях пьезокварцевым сенсором, модифицированным полимером с молекулярным отпечатком // *Аналитика России : материалы III Всерос. конф. Краснодар, 2009.* С. 409.
23. Рудакова Л. В., Байдичева О. В., Калач А. В., Рудаков О. Б., Селеменов В. Ф. Мультисенсорная система, основанная на цифровой регистрации эффектов набухания и контракции набора гранул сорбентов // *Аналитика России : материалы III Всерос. конф. Краснодар, 2009.* С. 151.



24. Jia-Xie Z., Jin-Rui X. Chiral amino-acid electrode for the determination of D-alanine // *Chem. J. Chin. Univ.* 1999. Vol. 20, № 20. P. 109–113.
25. Sarkar P., Tothill I. E., Setford S. J. Screen-printed amperometric biosensors for the rapid measurement of L- and D-amino acids // *Analyst.* 1999. Vol. 124, № 6. P. 865–870.
26. Титова Т. С., Паршина А. В., Бобрешова О. В. Определение глицина, альфа, бета-аланина, лейцина в кислых и щелочных водных растворах с использованием ПД-сенсоров // «ФАГРАН – 2012»: материалы VI Всерос. конф. Воронеж, 2012. С. 472–474.
27. Паршина А. В., Титова Т. С., Сафронова Е. Ю., Бобрешова О. В., Ярославцев А. Б. Определение глицина, аланина и лейцина при различных pH раствора с помощью ПД-сенсоров на основе гибридных мембран // *Журн. аналит. химии.* 2016. Т. 71, № 3. С. 272–281.
28. Титова Т. С., Паршина А. В., Бобрешова О. В. Потенциометрические мультисенсорные системы для определения глицина, аланина, лейцина в кислых растворах // Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья: материалы IV междунар. конф. Белгород, 2012. С. 383–384.
29. Bobreshova O. V., Parshina A. V., Polumestnaya K. A., Safronova E. Y., Yankina K. Y., Yaroslavtsev A. B. Sensors based on zirconia-modified perfluorinated sulfonic acid membranes sensitive to organic anions in multiionic aqueous solutions // *Petrol. Chem.* 2012. Vol. 52, № 7. P. 499–504.
30. Бобрешова О. В., Паршина А. В., Янкина К. Ю., Сафронова Е. Ю., Ярославцев А. Б. Гибридные перфторированные сульфосодержащие мембраны с наночастицами оксида циркония (IV) – электродно-активный материал потенциометрических сенсоров // *Рос. нанотехнологии.* 2013. Т. 8, № 11–12. С. 58–64.
31. Дуванова О. В., Зяблов А. Н. Проточно-инжекционное определение валина и олеиновой кислоты пьезосенсорами, модифицированными полимерами с молекулярными отпечатками // Сорбционные и хроматографические процессы. 2015. Т. 15, вып. 4. С. 558–562.
32. Бобрешова О. В., Паршина А. В., Рыжкова Е. А. Потенциометрическая мультисенсорная система для определения лизина в водных растворах с хлоридами калия и натрия // *Журн. аналит. химии.* 2010. Т. 65, № 8. С. 885–891.
33. Паршина А. В., Сафронова Е. Ю., Титова Т. С., Сафронов Д. В., Лысова А. А., Бобрешова О. В., Ярославцева А. Б. Потенциометрические перекрестно-чувствительные сенсоры на основе перфторированных мембран, обработанных при различной относительной влажности, для совместного определения катионов и анионов в щелочных растворах аминокислот // *Электрохимия.* 2017. Т. 53, № 11. С. 1464–1470.
34. Сафронова Е. Ю., Паршина А. В., Рыжкова Е. А., Сафронов Д. В., Бобрешова О. В., Ярославцева А. Б. ПД-сенсоры для определения аминокислот с несколькими азотсодержащими группами на основе мембран NAFION с оксидом циркония, обработанных в различных условиях // Мембраны и мембранные технологии. 2017. Т. 7, № 6. С. 432–440.
35. Паршина А. В., Сафронова Е. Ю., Титова Т. С., Бобрешова О. В., Прихно И. А., Ярославцева А. Б. ПД-сенсоры на основе мембран МФ-4СК и оксида кремния с гидрофобной поверхностью для определения катионов фенилаланина, валина и метионина // *Журн. общей химии.* 2016. Т. 86, вып. 6. С. 1035–1045.
36. Бобрешова О. В., Паршина А. В., Рыжкова Е. А. Использование программно-аппаратного комплекса для определения ионов лизина, калия, натрия и магния в водных растворах // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14, вып. 1. С. 86–95.
37. Safronova E., Parshina A., Kolganova T., Bobreshova O., Pourcelly G., Yaroslavtsev A. Potentiometric sensors arrays based on perfluorinated membranes and silica nanoparticles with surface modified by proton-acceptor groups, for the determination of aspartic and glutamic amino acids anions and potassium cations // *J. Electroanal. Chem.* 2018. Vol. 816. P. 21–29.
38. Бобрешова О. В., Паршина А. В., Агунова М. В., Полуместная К. А. Определение аминокислот, витаминов и лекарственных веществ в водных растворах с использованием новых потенциометрических сенсоров, аналитическим сигналом которых является потенциал Доннана // *Электрохимия.* 2010. Т. 46, № 11. С. 1338–1349.
39. Бобрешова О. В., Паршина А. В., Полуместная К. А., Тимофеев С. В. Потенциометрические сенсоры нового типа на основе перфторированных сульфокатионитовых мембран для количественного анализа многокомпонентных водных сред // Мембраны и мембранные технологии. 2011. Т. 1, № 1. С. 27–36.
40. Бобрешова О. В., Паршина А. В., Сафронова Е. Ю., Титова Т. С., Ярославцев А. Б. Потенциометрическое определение анионов глицина, аланина, лейцина и катионов калия в щелочных растворах с использованием мембран NAFION и МФ-4ск, модифицированных  $ZrO_2$  // Мембраны и мембранные технологии. 2015. Т. 5, № 2. С. 125–130.
41. Паршина А. В., Денисова Т. С., Бобрешова О. В. Сенсорные системы на основе ионообменных мембран для анализа многокомпонентных растворов // Мембраны и мембранные технологии. 2016. Т. 6, № 4. С. 329–350.

### Sensor System for Determining $\alpha$ -Amino Acids

O. V. Varygina, E. I. Selifonova, R. K. Chernova

Olga V. Varygina, ORCID 0000-0003-3640-5299, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, varygini@mail.ru

Ekaterina I. Selifonova, ORCID 0000-0003-2497-5489, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, slief-ei@yandex.ru

Rimma K. Chernova, ORCID 0000-0002-1693-2836, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, chernov-ia@yandex.ru





The principles of creating ion-selective electrodes for  $\alpha$ -amino acids in a historical retrospective are considered. It is shown that until recently, when the creation of potentiometric membrane sensors, the main emphasis was made on the formation of more selective sensors able to selectively determine the concentration of some analyte in multi-component systems. The material for such sensors were ion-selective membranes, which were created specific to a particular analyte, but were not specific to the entire class of such analyzers. In this respect, the characteristics of sensors, selective to  $\alpha$ -amino acids, developed on the basis of glass, reversible single-loading cations electrodes, by applying a thin layer of the enzyme. Enzymes (oxidase, asparaginase, etc.) catalyze the decomposition of the corresponding amino acids. The released gases are determined by the electrode, whose potential is proportional to the concentration of the amino acid. A new stage in the development of the sensor began with the opening of pagandom (otricatelnyh of ionophores with highly basic terminal groups, the crown calix [n]arenes, etc.) used to create sensors on the hydrochlorides of esters of amino acids. Discussed

the mechanism of formation of ionophores, the type of communication, analytical characteristics of the sensors. A cycle of works on creation of sensors based on registration of donnan potential at the ion-exchange polymer/solution boundary is considered. It is shown that nanomodification of the perfluorinated sulfocationite polymer overhang (membrane surface) increases the sensitivity of the sensor. Piezo-quartz resonators, sensors based on the digital recording of the effects of swelling and Contracting a set of sorbent granules, chiral amino acid electrodes are described. The formation of a new direction in the creation of sensors for  $\alpha$ -amino acids—potentiometric Multisensor systems based on ion exchange combined membranes, in which the analytical signal is the potential of Donnan, is noted. The possibilities of directional variation of the chemical properties of PD-sensors by modifying sulfatirovannah perfluorinated membranes. Estimated cross-sensitivity to multiple environments and reproducibility of the analytical characteristics of PD in multi-sensor systems. **Key words:** ion-selective electrodes,  $\alpha$ -amino acids, ion association, ionophore.

---

**Образец для цитирования:**

Варыгина О. В., Селифонова Е. И., Чернова Р. К. Сенсорные системы для определения  $\alpha$ -аминокислот (обзор) // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 261–267. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-261-267

**Cite this article as:**

Varygina O. V., Selifonova E. I., Chernova R. K. Sensor System for Determining  $\alpha$ -Amino Acids. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 261–267 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-261-267

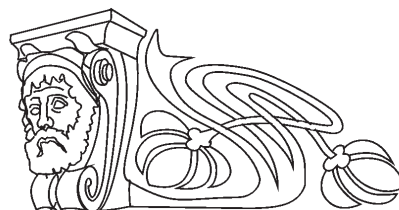
---



УДК 544.016.2+544.015.3+546.76+546.77+546.78

## ОБРАЗОВАНИЕ НЕПРЕРЫВНЫХ РЯДОВ ТВЕРДЫХ РАСТВОРОВ В СОЛЕВЫХ СИСТЕМАХ

И. К. Гаркушин, М. В. Чугунова, А. В. Бурчаков, С. Н. Милов



Гаркушин Иван Кириллович, доктор химических наук, заведующий кафедрой общей и неорганической химии, Самарский государственный технический университет, gik49@yandex.ru

Чугунова Марина Владимировна, кандидат химических наук, доцент кафедры химии Института «РЕАВИЗ», Самара, zave-marina@yandex.ru

Бурчаков Александр Владимирович, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и неорганической химии, Самарский государственный технический университет, turnik27@yandex.ru

Милов Сергей Николаевич, аспирант кафедры общей и неорганической химии, Самарский государственный технический университет, milov\_sergei@mail.ru

Образованию непрерывных рядов твердых растворов в тройных и более компонентных системах (замещения) без экстремумов в ликвидусе двойных систем из металлов, оксидов, солей посвящено значительное число работ. Твердые растворы – это твердотельные двух- или многокомпонентные однородные системы переменного состава (например типа  $A_xB_{1-x}$ ), в которых атомы или ионы компонентов, смешиваясь в различных соотношениях ( $0 < x < 1$ ), образуют общую кристаллическую решётку, характерную для одного из компонентов. Системы, в состав которых входят изоструктурные компоненты, как правило, образуют из-за неограниченной растворимости в твердом состоянии непрерывный ряд твердых растворов. Величина  $x$  в этом случае не лимитирована. Область существования ограниченных (граничных) твердых растворов (растворимость ограничена) на фазовой диаграмме имеет пределы по концентрации, зависящие от температуры. В работе приводится теоретический анализ условий образования непрерывных рядов твердых растворов в  $n$ -компонентных системах (трех- и более компонентных) в зависимости от образования бинарных твердых растворов в системах размерностью  $n-1$ . Приведены конкретные примеры систем, включающих молибдаты, вольфраматы, галогениды щелочных и щелочно-земельных элементов.

**Ключевые слова:** непрерывный ряд бинарных твердых растворов, система трехкомпонентная, многокомпонентная, молибдаты, вольфраматы, галогениды  $s^1$ - и  $s^2$ -элементов.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-268-277

Как показано в работах [1–3], свойства твердых растворов отличаются (иногда очень сильно) от свойств чистых компонентов. В частности, при образовании твердых растворов на основе металла возрастает твердость и уменьшается электропроводность вещества. Изменение состава твердых растворов позволяет в широких пределах варьировать свойствами сплавов, полу-

проводниковых материалов, ионных проводников, ферритов, лазерных материалов и получать материалы с нужными свойствами.

Рассматривая структуру твердых растворов, необходимо указывать кристаллическую решетку и параметр (параметры) элементарной ячейки. Признаком образования твердого раствора является сохранение типа решетки компонента-растворителя, сопровождающееся изменением размера элементарной ячейки. Параметры решетки в ряду твердых растворов часто меняются незначительно, но вполне закономерно меняются с составом. Это характерная особенность твердых растворов, что принципиально можно использовать для определения состава. Таким образом, твердый раствор, состоящий из двух или нескольких компонентов, имеет один тип решетки и представляет собой одну фазу. Отсюда следует, что неограниченная растворимость возможна только в том случае, если исходные компоненты обладают решеткой одного типа. Параметры кристаллической решетки твердого раствора линейно зависят от состава (правило Л. Вегарда) [4, 5].

Различают твердые растворы замещения, внедрения и вычитания. При образовании твердых растворов замещения число атомов или ионов в элементарной ячейке остаётся постоянным. Твердые растворы замещения образуются, когда один сорт атомов или ионов замещается на другой, незакономерно (беспорядочно) размещаясь в одной и той же атомной позиции в кристаллической структуре. Неограниченная растворимость возможна только в растворах замещения.

Юм-Розери сформулировал ряд правил для образования твердых растворов типа замещения [6–8]:

1) размерный фактор. Размеры атомов сплавляемых компонентов не должны различаться более чем на 10–15%;

2) структурный фактор. Решётки атомов растворителя и растворимого вещества должны быть изоморфны, т.е. структурно подобны;

3) валентный фактор. Атомы должны принадлежать к одному или соседним столбцам в таблице Менделеева, т.е. иметь валентность почти одинаковую. Атомы растворимого вещества должны быть гораздо меньше атомов растворителя.



В твердых растворах внедрения атомы растворенного элемента занимают межузельные позиции (пустоты) в решетке растворителя, внедряясь между атомами последнего. Твердые растворы внедрения образуются только в тех условиях, когда диаметр атома растворенного элемента невелик, например, в металлах атомы С, N, H. В полупроводниках часто встречаются случаи, когда растворенный элемент занимает частично позиции замещения и позиции внедрения, т. е. имеет место суперпозиция двух типов твердых растворов [9].

Если твердый раствор образуется на основе соединения, то возможен еще один тип твердых растворов – растворы вычитания. В твердых растворах вычитания один из элементов, образующих соединение, присутствует в количестве, превышающем формульное (как бы растворен в соединении стехиометрического состава), но при этом занимает в решетке соединения присущие ему позиции, а соответствующая часть позиций другого элемента остается незанятой (вакантной) [10, 11].

Образование твердых растворов в тройных и более сложных системах рассмотрено на частном примере образования непрерывных рядов бинарных твердых растворов  $M^I (Mo_xW_{1-x})O_4$  и  $M^{II} (Mo_xW_{1-x})O_4$  с участием молибдатов и вольфраматов щелочных ( $M^I$ ) и щелочноземельных ( $M^{II}$ ) элементов [12–15]. Введем необходимые обозначения:  $n$  – число компонентов системы,  $p$  – число систем низшей мерности с бинарными твердыми растворами замещения, входящих в ограничивающие элементы  $n$  – компонентной системы,  $q$  – число всех систем мерности  $(n-1)$ , входящих в  $n$  – компонентную систему. В системах простых классов ( $K||A$ , где  $K$  – катион (катионы),  $A$  – анион (анионы)),  $3||1$ ,  $1||3$ ,  $4||1$ ,  $1||4$ ,  $5||1$ ,  $1||5 \dots n||1$ ,  $1||n$  число компонентов равно числу систем ограничения, т. е.  $n = q$ . Во взаимных системах классов  $2||2$   $q = n + 1 = 4 (2 \cdot 2)$ ;  $2||3$ ,  $3||2$   $q = n + 2 = 6 = (3 \cdot 2) = (2 \cdot 3)$ ;  $2||4$ ,  $4||2$   $q = n + 3 = 8 (2 \cdot 4), (4 \cdot 2)$ .

Рассмотрим условия образования твердых растворов для указанных классов  $n$  – компонентных систем в зависимости от образования их в системах мерностью  $n-1$ .

**Тройные системы.** Условием образования твердых растворов в системах классов  $3||1$ ,  $1||3$  является образование устойчивых твердых растворов на одной бинарной стороне ( $p = q - 2 = n - 2 = 1$ ), а также близкая топология ликвидуса остальных двух двойных систем.

Для тройных систем классов  $3||1$  и  $1||3$  без соединений и с соединениями фазовые комплексы показаны на рис. 1. Если в системе отсутствует двойное соединение (см. рис. 1, *a, б*), то поверхность кристаллизации представлена двумя поля-

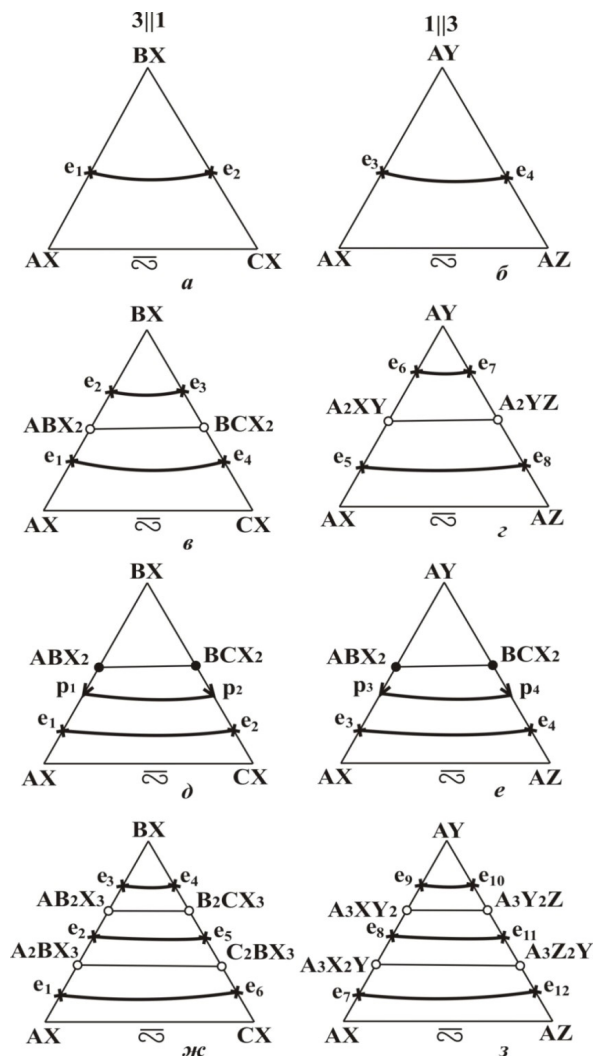


Рис. 1. Схема образования непрерывных рядов твердых растворов в тройных системах классов  $3||1$ ,  $1||3$ : *a, б* – без соединения, *в, г* – с двумя соединениями конгруэнтного плавления на двух боковых сторонах; *д, е* – с двумя соединениями инконгруэнтного плавления на боковых сторонах; *ж, з* – с двумя соединениями конгруэнтного плавления на двух боковых сторонах

ми кристаллизации: исходных компонентов  $BX$  ( $AY$ ) и непрерывных рядов твердых растворов (без экстремумов)  $A_xB_{1-x}X$  ( $AX_yZ_{1-y}$ ). Системы представлены одним симплексом. Пример – системы  $M||Cl$ ,  $MoO_4$ ,  $WO_4$  ( $M$  – Ca, Sr, Ba) [15].

Тройные системы с одним соединением конгруэнтного плавления (см. рис. 1, *б, в*) представлены тремя полями кристаллизации: исходных компонентов  $BX$  ( $AY$ ) и непрерывными рядами твердых растворов на основе исходных компонентов  $A_xC_{1-x}X$  ( $AX_yZ_{1-y}$ ) и соединений  $ABX_2$  и  $BCX_2$  (см. рис. 1, *в*),  $A_2XY$  и  $A_2YZ$  (см. рис. 1, *г*). Указанные соединения разбивают треугольники составов на два симплекса:  $AX-ABX_2-BCX_2-CX$  и  $BX-ABX_2-BCX_2$  (см. рис. 1, *в*);  $AX-A_2XY-$



$-A_2YZ-AZ$  и  $AY-A_2XY-A_2YZ-AZ$  (см. рис. 1, *з*).  
Пример – система  $Na||Cl, MoO_4, WO_4$  [15].

Аналогично тремя полями кристаллизации представлены поверхности ликвидусов тройных систем с двумя соединениями инконгруэнтного плавления на двух боковых сторонах (также системы разбиваются на два симплекса, см. рис. 1, *д*, *е*). Пример – системы  $M||F, MoO_4, WO_4$  ( $M - Na, K$ ) [15].

В случае, приведенном на рис. 1, *ж*, *з* (наличие по два соединения конгруэнтного плавления на боковых сторонах  $AX-BX, BX-CX$  и  $AX-AY, AY-AZ$ ), поверхности ликвидусов представлены четырьмя полями кристаллизации: исходных компонентов  $BX$  ( $AY$ ), непрерывных рядов твердых растворов исходных компонентов  $A_xC_{1-x}X$  ( $AX_yZ_{1-y}$ ) и двойных соединений  $A_2BX_3$  и  $C_2BX_3$  ( $A_3X_2Y$  и  $A_3Z_2Y$ ),  $AB_2X_3$  и  $CB_2X_3$  ( $A_3XY_2$  и  $A_3Y_2Z$ ).

Указанные соединения разбивают остовы составов на три симплекса:  $AX-A_2BX_3-C_2BX_3-CX$  ( $AX-A_3X_2Y-A_3Z_2Y-AZ$ ),  $A_2BX_3-AB_2X_3-B_2CX_3-C_2BX_3$  ( $A_3X_2Y-A_3XY_2-A_3Y_2Z-A_3Z_2Y$ ),  $AB_2X_3-BX-B_2CX_3$  ( $A_3XY_2-AY-A_3Y_2Z$ ). Примером могут служить системы, в которых две боковые стороны тройных систем имеют одинаковую топологию ликвидуса. Аналогично разбиваются на симплексы и системы при наличии соединений инконгруэнтного плавления. Изменяется лишь несколько топология ликвидуса.

*Тройные взаимные системы.* Для систем, содержащих два катиона и два аниона  $n = 3, q = 4$ . число систем ограничения с непрерывными рядами твердых растворов определится соотношением  $p = n - 1 = q - 2 = 2$ .

Тройные взаимные системы (2||2) без соединений представлены одним симплексом (рис. 2, *а*)

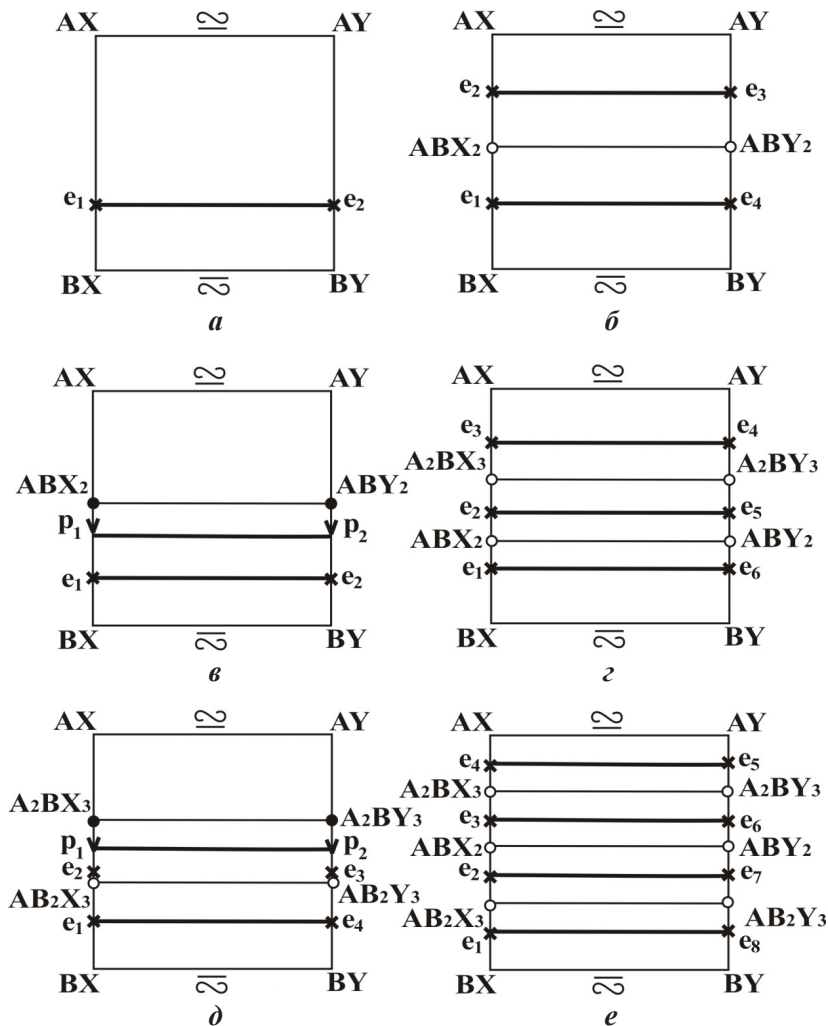


Рис. 2. Тройные взаимные системы: *а* – без соединения, *б* – с двумя соединениями конгруэнтного плавления, *в* – с двумя соединениями инконгруэнтного плавления, *г* – с четырьмя соединениями конгруэнтного плавления, *д* – с двумя соединениями конгруэнтного и двумя соединениями инконгруэнтного плавления, *е* – с шестью соединениями конгруэнтного плавления на противоположных боковых гранях



и поверхность кристаллизации имеет два поля непрерывных рядов твердых растворов  $AX_2Y_{1-z}$  и  $BX_1Y_{1-t}$ .

Наличие соединений конгруэнтного плавления разбивает остов составов на два симплекса (рис. 2, б):  $AX-ABX_2-ABY_2-AY$  и  $ABX_2-ABY_2-BY-BX$ , а поверхность ликвидуса представлена тремя полями кристаллизации непрерывных рядов твердых растворов исходных веществ  $AX_2Y_{1-z}$ ,  $BX_1Y_{1-t}$  и соединений  $ABX_2$  и  $ABY_2$ .

Аналогичную морфологию имеет ликвидус тройной взаимной системы с наличием двух соединений инконгруэнтного плавления (см. рис. 2, в). Два соединения конгруэнтного плавления на противоположных сторонах разбивают квадрат составов на три симплекса (см. рис. 2, з):  $AX-A_2BX_3-A_2BY_3-AY$ ,  $A_2BX_3-A_2BY_3-ABY_2-ABX_2$  и  $ABX_2-ABY_2-BY-BX$ . Поверхность кристаллизации представлена четырьмя полями: двумя полями непрерывных рядов твердых растворов между исходными веществами  $AX$  и  $AY$ ,  $BX$  и  $BY$ , а также между однотипными соединениями –  $A_2BX_3$  и  $A_2BY_3$ ,  $ABX_2$  и  $ABY_2$ .

Аналогичное строение имеет ликвидус систем, в которых на противоположных бинарных сторонах по два соединения: одно – конгруэнтного, а другое – инконгруэнтного плавления (см. рис. 2, д). При наличии по три двойных соединения конгруэнтного плавления на противоположных сторонах квадрат составов разбивается на четыре симплекса (см. рис. 2, е):  $AX-A_2BX_3-A_2BY_2-AY$ ,  $A_2BX_3-A_2BY_3-ABY_2-ABX_2$ ,  $AB_2X_3-AB_2Y_3-ABY_2-ABX_2$ ,  $BX-AB_2X_3-AB_2Y_3-BY$ .

Примером являются системы  $Na, M || MoO_4, WO_4$  ( $M-Ca, Sr, Ba$ ). В качестве примера приведена система  $Na, Sr || MoO_4, WO_4$  (рис. 3) [15].

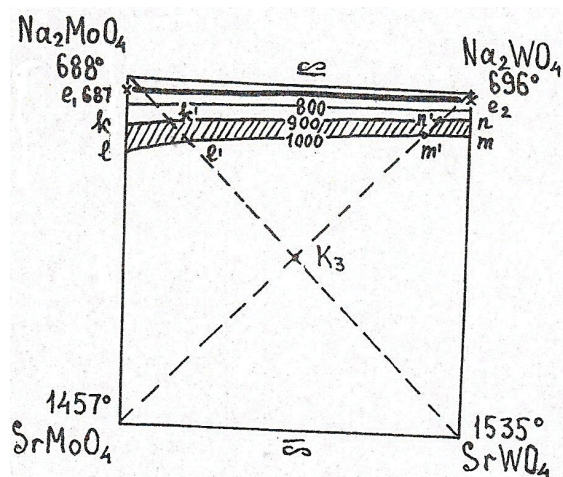


Рис. 3. Проекция политермы кристаллизации  $Na, Sr || MoO_4, WO_4$  на квадрат составов

Поверхность ликвидуса представлена двумя полями кристаллизации непрерывных рядов твердых растворов между исходными веществами  $AX$  и  $AY$ ,  $BX$  и  $BY$  и тремя полями кристаллизации непрерывных твердых растворов между однотипными соединениями ( $A_2BX_3$  и  $A_2BY_3$ ,  $ABX_2$  и  $ABY_2$ ,  $AB_2X_3$  и  $AB_2Y_2$ ). Две боковые системы квадрата составов имеют близкое строение ликвидусов, а две системы образуют непрерывный ряд твердых растворов без экстремумов.

**Четырехкомпонентные системы.** Из четырех тройных систем, входящих в системы классов  $4||1, 1||4$ , две тройные системы должны иметь одинаковую топологию ликвидуса с наличием точек невариантных равновесий, т.е. число систем с бинарными твердыми растворами будет равно  $p = n - 2 = q - 2 = 2$  ( $n = 4, q = 4$ ) (рис. 4, а):  $AX-CX-DX, AX-BX-CX$ . Тетраэдр представлен тремя объемами кристаллизации – компонентов  $BX, DX$  и непрерывных рядов твердых растворов между  $AX$  и  $CX$ .

В случае образования двух соединений конгруэнтного плавления  $ADX_2$  и  $CDX_2$  на двойных сторонах  $AX-DX$  и  $CX-DX$  (см. рис. 4, б) остов составов разбивается на два симплекса, в которых реализуется как минимальное только моновариантное равновесное состояние для линий  $E_1E_2$  и  $E_3E_4$ , получаемых пересечением пяти поверхностей кристаллизации.

Объемы кристаллизации тетраэдра представлены двумя исходными компонентами  $DX, CX, CX$ , двумя рядами непрерывных твердых растворов между исходными веществами  $AX$  и соединения  $ADX_2$  и  $CDX_2$ . Практически аналогичное строение в проекции на плоскость имеет четырехкомпонентная система с соединениями инконгруэнтного плавления (см. рис. 4, в). Образование по два двойных соединения на противоположных боковых двойных сторонах остова составов (см. рис. 4, з) разбивает тетраэдр на три симплекса  $AX-BX-A_2CX_3-A_2DX_3, A_2CX_3-A_2DX_3-BX-AD_2X_3-AC_2X_3, AD_2X_3-AC_2X_3-BX-CX-DX$ , в которых реализуются только ди- и моновариантные равновесные состояния. В целом тетраэдр представлен двумя объемами кристаллизации компонентов  $AX, BX$  и тремя объемами кристаллизации бинарных непрерывных рядов твердых растворов: между  $CX$  и  $DX, AD_2X_3$  и  $AC_2X_3, A_2DX_3$  и  $A_2CX_3$ . Примером служит секущий сфеноид  $(NaCl)_2-(KCl)_2-CaMoO_4-CaWO_4$  [16–23].

**Четырехкомпонентные взаимные системы.** Обозначим число тройных систем, входящих в четырехкомпонентную взаимную, через  $m$ , а тройных взаимных – через  $l$ , т.е.  $m + l = q$ . Для

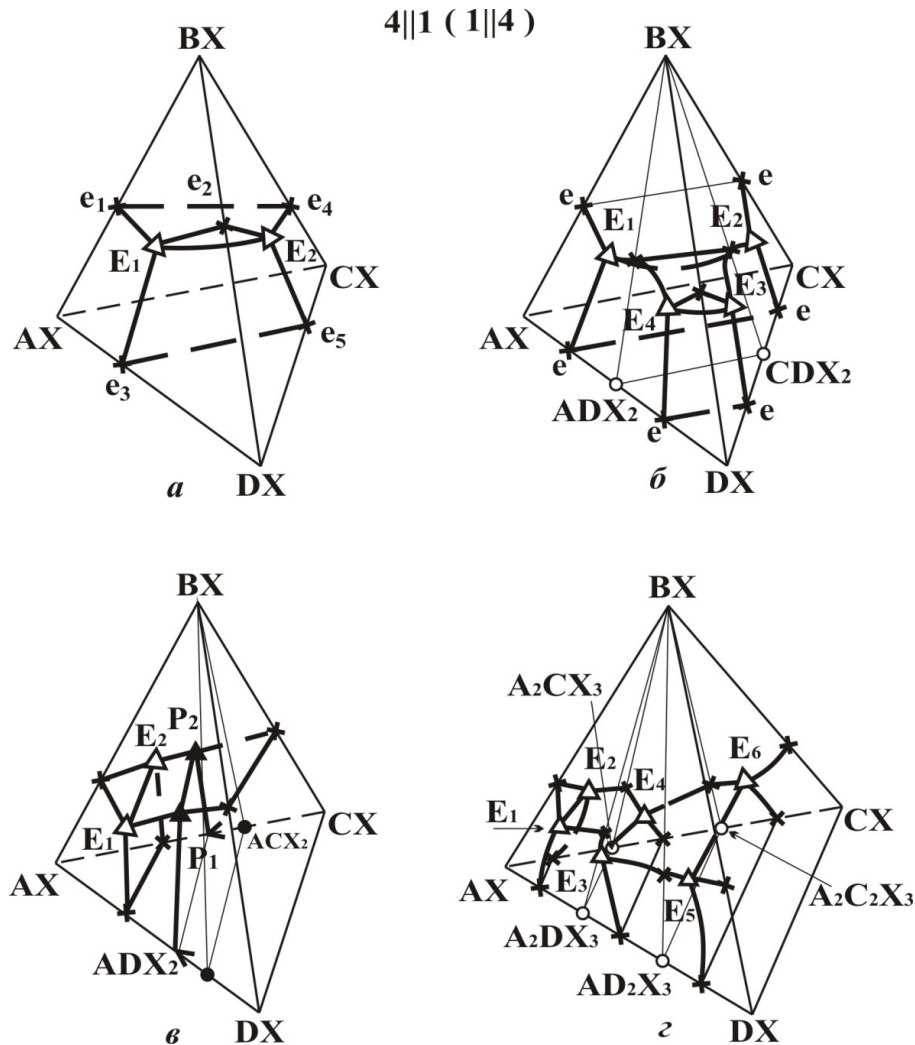


Рис. 4. Четырехкомпонентные системы (классы  $4\parallel 1, 1\parallel 4$ ): *a* – без соединения, *б* – с двумя соединениями конгруэнтного плавления, *в* – с двумя соединениями инконгруэнтного плавления, *г* – с четырьмя соединениями конгруэнтного плавления

систем классов  $2\parallel 3$  число тройных систем с непрерывными рядами бинарных твердых растворов должно быть равно 2, тройных взаимных систем – 1. Общее число систем с твердыми растворами равно 3. Для класса  $3\parallel 2$  число тройных систем с близкой морфологией ликвидуса равно 2, а число тройных взаимных систем с непрерывными рядами бинарных твердых растворов равно 3, т.е. общее число систем с твердыми растворами также равно 3.

В четырехкомпонентных взаимных системах ( $3\parallel 2, 2\parallel 3$ ) без соединений в случае наличия эвтектик в тройных системах (рис. 5, *a*) призма составов представлена тремя объемами кристаллизации непрерывных рядов твердых растворов между веществами AX и AY, VX и VY, CX и CY.

Если тройные эвтектики образуются в двух смежных тройных взаимных системах  $A, B\parallel X, Y$ ;

$A, C\parallel X, Y$ , а в одной тройной взаимной системе  $B, C\parallel X, Y$  и двух тройных системах  $A, B, C\parallel X$  и  $A, B, C\parallel Y$  образуются непрерывные ряды твердых растворов, то призма составов представлена двумя симплексами  $AY-AX-BX-CX$  и  $AY-BX-CX-CY-BY$ , соединенными стабильным треугольником  $AY-BX-CX$  (см. рис. 5, *б*). В целом призма составов представлена двумя объемами кристаллизации компонентов AX, AY и двумя объемами кристаллизации непрерывных рядов твердых растворов VX и CX, VY и CY.

Образование двух соединений конгруэнтного плавления  $BCX_2$  и  $BCY_2$  (см. рис. 5, *в*) на противоположных сторонах тройной взаимной системы  $B, C\parallel X, Y$  приводит к разбиению призмы составов на два симплекса (шестивершинника)  $AX-BX-BCX_2-BCY_2-AY-BY$  и  $AX-BCX_2-CX-CY-BCY_2-AY$ , в которых на линиях моновари-

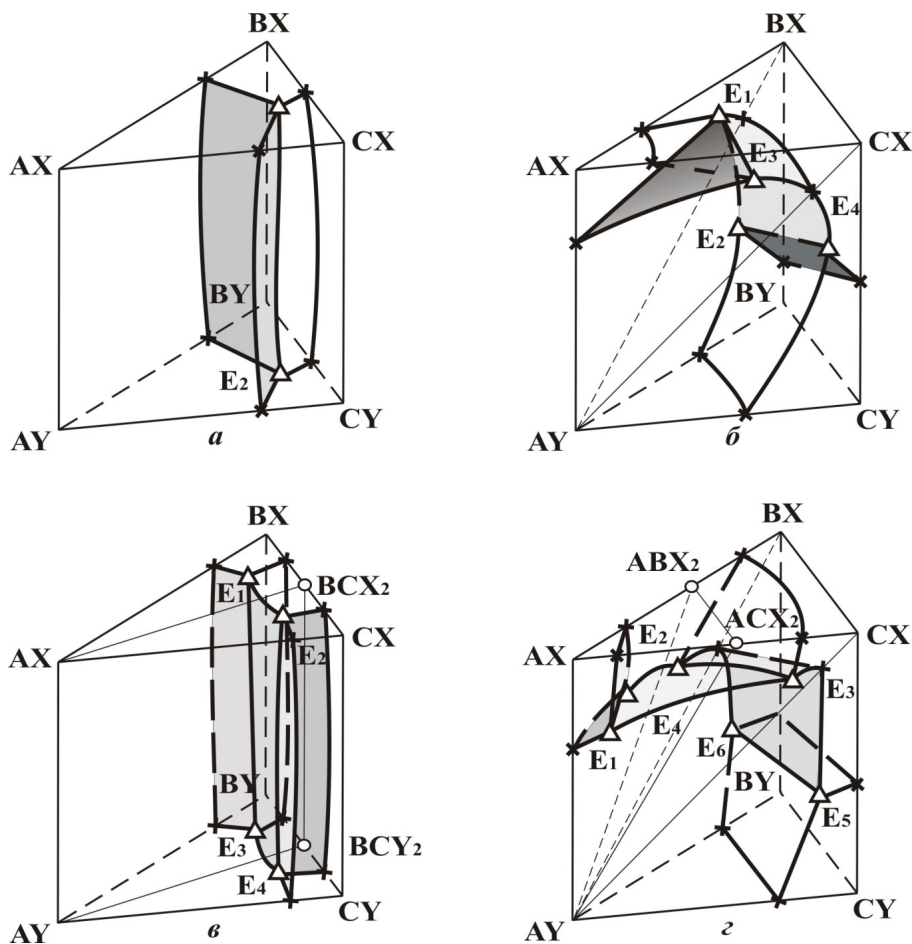


Рис. 5. Четырехкомпонентные взаимные системы (класс 3||2, 2||3): а, б – без соединения, в, г – с двумя соединениями конгруэнтного плавления

антных равновесий  $E_1E_3$  и  $E_2E_4$  могут кристаллизироваться по три твердые фазы.

Призма имеет три объема кристаллизации: непрерывных рядов твердых растворов исходных веществ AX и AY, BX и BY, CX и CY и один объем кристаллизации непрерывного ряда твердых растворов соединений  $BCX_2$  и  $BCY_2$ .

В случае двух соединений конгруэнтного плавления  $ABX_2$  и  $ACX_2$  (см. рис. 5, г) на двойных сторонах AX–BX, AX–CX тройной системы A,B,C||X призма составов разбивается на три симплекса: AX– $ABX_2$ – $ACX_2$ –AY (тетраэдр), AY– $ABX_2$ –BX–CX– $ACX_2$  (пятивершинник) и AY–BX–CX–CY–BY (пятивершинник). Призма составов представлена двумя объемами кристаллизации исходных компонентов AX, AY и тремя объемами кристаллизации непрерывных рядов твердых растворов между BX и CX, BY и CY,  $ABX_2$  и  $ACX_2$ .

Возможны и другие варианты образования непрерывных рядов твердых растворов в четырехкомпонентных системах. Примером указанных си-

стем являются следующие: K,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>, Na,K,Ca||MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>, Na,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>, система Na,Sr || Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> (рис. 6) [24–26].

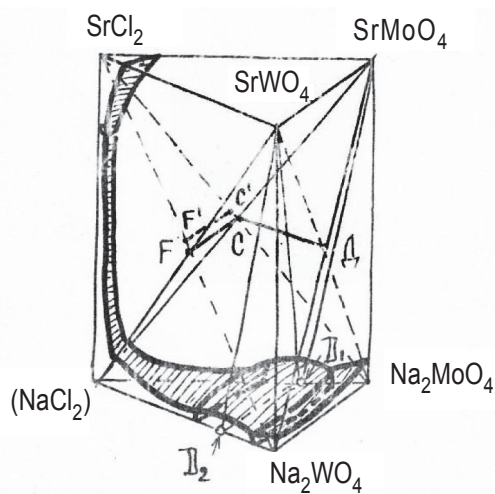


Рис. 6. Схема объемов кристаллизации системы Na,Sr || Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>



**Пятикомпонентные системы.** Для классов систем 5||1, 1||5 для образования твердых растворов необходимо образование их в трех четырехкомпонентных системах  $p = n - 2 = q - 2 = 3$ ,  $n = 5$ ,  $q = 5$ .

Однако, как показали экспериментальные исследования методом ДТА стабильных пентатопов пятикомпонентных взаимных систем Na,K,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> [27], Na,K,Ba||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> [28], для образования твердых растворов достаточно образование их в двух четырехкомпонентных системах:  $p = n - 3 = q - 3 = 2$ .

**Пятикомпонентные взаимные системы.** Класс 4||2. Общее число систем  $q' = m' + l'$ , где  $m'$  – число систем класса 4||1 и  $l'$  – число систем класса 3||2,  $q' = 4 + 2 = 6$ . Для класса 2||4  $q' = 2 + 4 = 6$  ( $m' = 2$ ,  $l' = 4$ ). Число систем с твердыми растворами  $p = n - 1 = q - 2 = 4$  ( $n = 5$ ,  $q = 6$ ).  $p = 4$ , если  $m' = 2$  и  $l' = 2$  (для классов 2||4 и 4||2).

**Пятикомпонентные взаимные системы.** Класс 3||3. Условием образования непрерыв-

ных рядов твердых растворов будет  $p = n - 1 = q - 2 = 4$  ( $n = 5$ ,  $q = 6$ ). Конкретно по классам четырехкомпонентных взаимных систем:  $p = 4$  при  $m' = 1$  (класс 3||2) и  $l' = 3$  (класс 2||3). В этом случае общее число систем класса 3||2 равно 3 и  $q' = m' + l' = 3 + 3 = 6$ .

Примером таких систем могут служить системы Na,K,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> [27], Na,K,Ba||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>, Na,K,Ba||F,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> [28].

Так, в системе Na,K,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> две четырехкомпонентные системы с наличием точек невариантных равновесий (Na,K,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub> и Na,K,Ca||Cl,WO<sub>4</sub>) и четыре системы с образованием непрерывных рядов бинарных твердых растворов на основе компонентов и соединений (Na,K||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>; Na,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>; K,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>; Na,K,Ca||MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub>).

Таким образом, общим условием образования непрерывных рядов твердых растворов в  $n$ -компонентных системах в зависимости от образования их в  $(n-1)$  – компонентных системах являются условия, которые сведены в таблицу.

**Условия образования непрерывных рядов твердых растворов в  $n$ -компонентных системах**

Число компонентов, $n$	Класс систем $n  A$ ( $n$ – катион, $A$ – анион)	Общее число систем мерностью $n - 1, q$	Число солей $n \cdot A$	Число систем с твердыми растворами, $p$	Число систем ограничения с невариантными точками, $q - p$
3	1  3	3	3	1	2
3	2  2	4	4	2	2
4	1  4	4	4	2	2
4	3  2, 2  3	5	6	3	2
5	1  5	5	5	3	2
5	3  3	6	9	4	2
5	4  2, 2  4	6	8	4	2

Однако бывают случаи, когда ликвидусы двойных систем различны по морфологии, например, с разным числом соединений (с одним соединением) ABX<sub>2</sub> (рис. 7, а); B<sub>2</sub>XY (см. рис. 7, б); с двумя соединениями A<sub>2</sub>X<sub>2</sub>Y, A<sub>2</sub>X<sub>2</sub>Y на стороне AX–AY и одним B<sub>2</sub>XY на другой стороне BX–BY (см. рис. 7, в), при образовании устойчивых бинарных твердых растворов между компонентами и соединениями появляются точки выклинивания. Возможно образование, в редких случаях, двух точек выклинивания при одинаковой морфологии ликвидусов двойных систем (см. рис. 7, г). Примером такого типа систем являются следующие: CsNO<sub>2</sub>–Ba(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>–TiNO<sub>2</sub>; KF–CaF<sub>2</sub>–SrF<sub>2</sub>; NaF–Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>–Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [16]; Li,Sr||Cl,Br; K||Cl,ClO<sub>3</sub>,NO<sub>3</sub>; Cs,Cd||Br,I; Cs,Pb||Cl,Br; K,Pb||Br,I; Li,Na||SO<sub>4</sub>,CrO<sub>4</sub>; Li,Rb||NO<sub>2</sub>,NO<sub>3</sub>; K,Rb||F,CO<sub>3</sub>; K,Rb||F,CO<sub>3</sub>; Li,Na||CrO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> [21].

Возможны варианты, когда в тройных, тройных взаимных и более сложных системах имеются области расслаивания в жидкой фазе. Некоторые варианты образования одной (рис. 8, а) и двух областей расслаивания (см. рис. 8, б, в, г) с устойчивыми бинарными твердыми растворами в тройных системах показаны на рис. 8. В качестве примера трехкомпонентных систем с расслоением в жидкой фазе можно привести следующие: LiF–Li<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>–KBr, LiF–NaBr–KBr, LiF–NaF–KBr, LiF–NaBr–RbBr, LiF–NaF–RbBr, LiF–NaBr–CsBr, LiF–NaF–CsBr [20]. В этом случае поверхность ликвидуса представлена двумя полями кристаллизации компонента – AY и непрерывных рядов твердых растворов между AX и AZ. В поле кристаллизации одного компонента (BX) существует область расслоения.



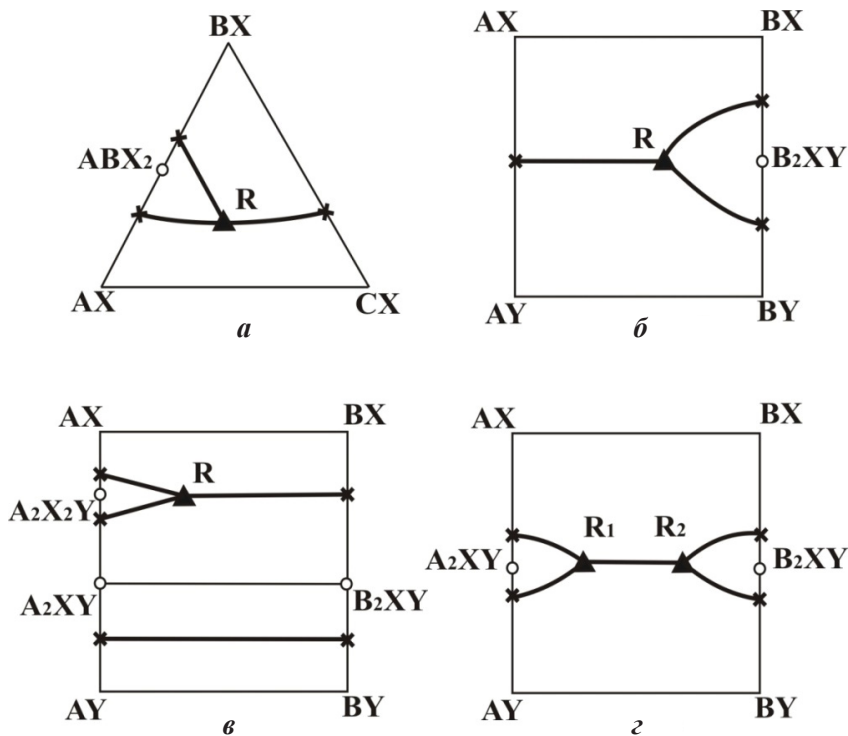


Рис. 7. Ликвидусы тройных и тройных взаимных систем с выклиниванием одного (а, б) и двух (в, г) соединений конгруэнтного плавления

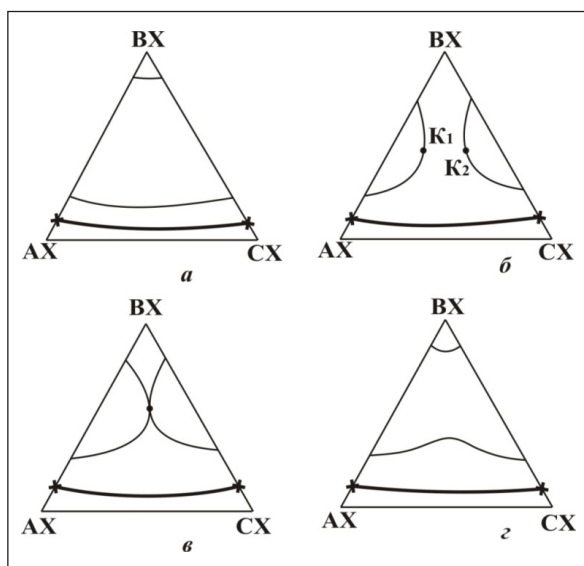


Рис. 8. Ликвидусы систем с областями расслаивания одной (а) и двумя (б, в, г)

Однако если в расплаве содержатся либо катионы, либо анионы, близкие или меньше по ионному радиусу катионов (анионов), кристаллизующихся в виде твердых растворов, может происходить образование ограниченной растворимости (разрыв сплошности бинарных твердых растворов), т.е. распад твердых растворов с образованием эвтектических (рис. 9,

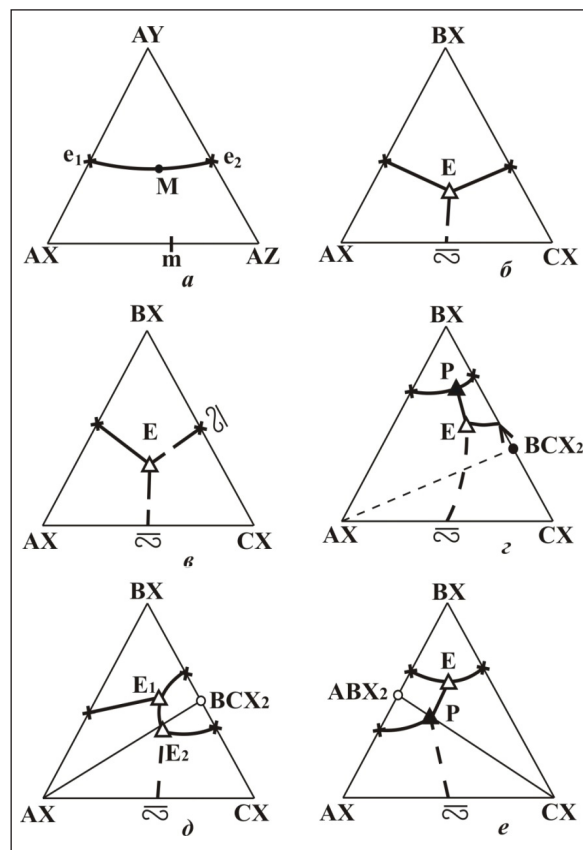


Рис. 9. Тройные системы с распадом бинарных твердых растворов с минимумом внутри тройных систем



б, в, г, д) и перитектических (рис. 9, е) точек невариантных равновесий.

В результате анализа топологических структур систем из трех и более компонентов с участием галогенидов, сульфатов, хроматов, молибдатов, вольфраматов и других солей была выявлена следующая закономерность: количество систем ограничения мерностью  $n-1$  с наличием точек невариантных равновесий должно быть всегда равным 2. Топологический анализ позволяет провести прогнозирование фазовых диаграмм состояния с непрерывными рядами твердых растворов.

С увеличением числа компонентов ( $n = 5, 6$  и т.д.)  $m$  может равняться 3, 4 и т.д., т.е. в таких системах наблюдается «нивелирование» (вырождение) ликвидуса. Это подтверждено экспериментальным исследованием стабильных пентатопов систем  $\text{Na, K, Ba} \parallel \text{Cl, MoO}_4, \text{WO}_4$  [27],  $\text{Na, K, Ca} \parallel \text{Cl, MoO}_4, \text{WO}_4$  [28]. В этих системах значительными гиперобъемами и гиперплоскостями кристаллизации представлены твердые растворы между молибдатами и вольфраматами щелочноземельных металлов.

#### Благодарности

Работа выполнена в рамках базовой части государственного задания Самарского государственного технического университета (проект № 4.5534.2017/8.9).

#### Список литературы

1. Краткая химическая энциклопедия : в 6 т. / под ред. И. Л. Кнунянца. М. : Сов. энцикл., 1961–1967.
2. Краткая химическая энциклопедия : в 2 т. / под ред. И. Л. Кнунянца. М. : Сов. энцикл., 1988. Т. 1 ; 1990. Т. 2.
3. Курнаков Н. С. Избранные труды : в 3 т. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1960. Т. 1 ; 1961. Т. 2 ; 1963. Т. 3.
4. Vegard L. Die Konstitution der Mischkristalle und die Raumfüllung der Atome // Zeitschrift für Physik. 1921. Vol. 5. P. 17–26.
5. Вест А. Химия твердого тела. Теория и приложения : в 2 ч. / пер. с англ. М. : Мир, 1988. Ч. 1. 558 с.
6. Юм-Розери В. Электроны и металлы. М. : Metallurgizdat, 1949. 364 с.
7. Юм-Розери В., Рейнор Г. Структура металлов и сплавов. М. : Metallurgizdat, 1959. 392 с.
8. Гороновский И. Т., Назаренко Ю. П., Некряч Е. Ф. Краткий справочник по химии. Киев : Наук. думка, 1987. 830 с.
9. Юм-Розери В. О структуре сплавов железа // Успехи физических наук. 1966. Т. 88, № 1. С. 125–148.
10. Введение в физико-химический анализ. 4-е изд. доп. / под ред. В. Я. Аносова, М. А. Ключко. М. ; Л. : АН СССР, 1940. 563 с.
11. Петров Д. А. Двойные и тройные системы. М. : Металлургия, 1986. 256 с.
12. Гаркушин И. К. Применение солевых, оксидно-солевых и оксидных составов в технологии // Термический анализ и фазовые равновесия. Пермь : ПГУ, 1984. С. 101–111.
13. Трунин А. С., Мифтахов Т. Т., Цой Л. А., Селемнев А. П. О морфологии ликвидусов двухкомпонентных систем из хлоридов щелочных металлов // Всесоюз. конф. по химии и технол. редких щелочных элементов : тез. докл. М. : Наука, 1977. С. 101–102.
14. Захаров М. Е. Диаграммы состояния двойных и тройных систем. М. : Metallургия, 1978. 296 с.
15. Трунин А. С., Гаркушин И. К., Дибиров М. А. Об образовании твердых растворов в системах с участием молибдатов и вольфраматов щелочных и щелочноземельных элементов // Совершенствование процессов нефтепереработки и нефтехимии : сб. науч. тр. Куйбышев : Авиац. ин-т, 1982. С. 114–120.
16. Диаграммы плавкости солевых систем. Тройные системы / под ред. В. И. Посыпайко, Е. А. Алексеевой. М. : Химия, 1977. 328 с.
17. Воскресенская Н. К., Евсеева Н. Н., Беруль С. И., Верещатина И. П. Справочник по плавкости систем из безводных неорганических солей : в 2 т. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1961. Т. 1. 845 с. ; Т. 2. 585 с.
18. Коршунов В. Г., Сафонов В. В., Дробот Д. В. Фазовые равновесия в галогенидных системах. М. : Metallургия, 1979. 182 с.
19. Гаркушин И. К. Физико-химические основы получения составов различного назначения на основе диаграмм состояния // Перспективы использования физико-химического анализа для разработки технологических процессов и методов аналитического контроля, химического и фармацевтического производств : тез. докл. республ. конф. : в 2 ч. Пермь : ПГУ, 1985. Ч. 1. С. 86.
20. Егорцев Г. Е. Фазовые равновесия в системах из фторидов и бромидов щелочных металлов : автореф. дис. ... канд. хим. наук. Самара, 2007. 24 с.
21. Диаграммы плавкости солевых систем. Тройные взаимные системы / под ред. В. И. Посыпайко, Е. А. Алексеевой. М. : Химия, 1977. 392 с.
22. Гаркушин И. К., Кондратюк И. М., Дворянова Е. М., Данилушкина Е. Г. Анализ, прогнозирование и экспериментальное исследование рядов систем из галогенидов щелочных и щелочно-земельных металлов. Екатеринбург : УрО РАН, 2006. 148 с.
23. Бергман А. Г., Домбровская Н. С. Об обменном разложении в отсутствие растворителя // Журн. Рос. физ.-хим. о-ва, 1929. Т. LXI, вып. 8. С. 1451–1478.
24. Трунин А. С., Гаркушин И. К., Штерг Г. Е. Исследование четверной взаимной системы  $\text{K, Ca} \parallel \text{Cl, MoO}_4, \text{WO}_4$  // Журн. неорг. химии. 1977. Т. 22, вып. 12. С. 3338–3341.
25. Трунин А. С., Мифтахов Т. Т., Гаркушин И. К., Гасаналиев А. М., Воловик Ю. И. Термический анализ



- системы Na,K,Ca||MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 1979. Т. 22, вып. 6. С. 651–653.
26. Трунин А. С., Гаркушин И. К., Штер Г. Е. Изучение химического взаимодействия в четверной взаимной системе Na,Ca||Cl,MoO<sub>4</sub>,WO<sub>4</sub> конверсионным методом // Укр. хим. журнал. 1978. Т. 44, вып. 5. С. 456–45.
27. Garkushin I. K., Trunin A. S., Shter G. E., Gassanaliyev A. M. Use of DTA the investigation of five componental reciprocal system Na, K, Ca||Cl, MoO<sub>4</sub>, WO<sub>4</sub> by means of conversional method // Fifth Intern. Conf. on Thermal Analysis. Kyoto, August 1977. Kyoto, 1977. P. 519–521.
28. Посыпайко В. И. Методы исследования многокомпонентных солевых систем. М.: Наука, 1978. 255 с.

### Formation of Continuous Series of Solid Solutions in Salt Systems

I. K. Garkushin, M. V. Chugunova,  
A. V. Burchakov, S. N. Milov

Ivan K. Garkushin, ORCID 0000-0001-6038-8519, Samara State Technical University, 244, Molodogvardeyskaya Str., Samara, 443100, Russia, gik49@yandex.ru

Marina V. Chugunova, ORCID 0000-0002-2045-6684, Medical University "REAVIZ", Samara, 227, Chapaevskaya Str., Samara, 443001, Russia, zave-marina@yandex.ru

Alexander V. Burchakov, ORCID 0000-0002-3202-3405, Samara State Technical University, 244, Molodogvardeyskaya Str., Samara, 443100, Russia, turnik27@yandex.ru

Sergey N. Milov, ORCID 0000-0001-8531-5885, graduate student, Samara State Technical University, 244, Molodogvardeyskaya Str., Samara, 443100, Russia, milov\_sergei@mail.ru

Formation of continuous series of solid solutions in ternary and more component systems (reciprocal systems) without extremum in liquidus of binary systems, consist of metals, oxides, salts has been devoted to a considerable number of works. Solid solutions are solid two- or multicomponent homogeneous systems of variable composition (for example, type A<sub>x</sub>B<sub>1-x</sub>), in which atoms or ions of components, mixing in different ratios (0 < x < 1), form a common crystal lattice, characteristic of one of components. Systems in which the isostructural components are composed, as a rule, form a continuous series of solid solutions because of unlimited solubility in the solid state. The quantity x in this case is not limited to. The region of existence of bounded (boundary) solid solutions (solubility is limited) on the phase diagram has concentration limits that depend on temperature. The theoretical analysis of the conditions for the formation of continuous series of solid solutions in n-component systems (three or more component ones) depending on the formation of binary solid solutions in n-1 systems is given in this paper. Specific examples of systems including molybdates, tungstates, halides of alkaline and alkaline-earth elements are given.

**Key words:** continuous series of binary solid solutions, ternary system, multicomponent system, molybdates, tungstates, halides of s<sup>1</sup>- and s<sup>2</sup>-elements.

**Acknowledgements:** The work was carried out within the framework of the basic part of the state task of the Samara State Technical University (project no. 4.5534.2017 / 8.9).

### Образец для цитирования:

Гаркушин И. К., Чугунова М. В., Бурчаков А. В., Милов С. Н. Образование непрерывных рядов твердых растворов в солевых системах // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 268–277. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-268-277

### Cite this article as:

Garkushin I. K., Chugunova M. V., Burchakov A. V., Milov S. N. Formation of Continuous Series of Solid Solutions in Salt Systems. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 268–277 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-268-277



УДК [544.344.016+536.44]:[544.344.013–14+544.344.4]

## ТОПОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ФАЗОВОЙ ДИАГРАММЫ РАЗРЕЗА 2 ТЕТРАЭДРА СОСТАВА ЧЕТВЕРНОЙ СИСТЕМЫ НИТРАТ КАЛИЯ – ВОДА – ПИРИДИН – МАСЛЯНАЯ КИСЛОТА В ИНТЕРВАЛЕ 5–60°C



Д. Г. Черкасов, З. В. Чепурина, К. К. Ильин

Черкасов Дмитрий Геннадиевич, доктор химических наук, заведующий кафедрой общей и неорганической химии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [ilinkk@info.sgu.ru](mailto:ilinkk@info.sgu.ru)

Чепурина Зинаида Валерьевна, кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры общей и неорганической химии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [ilinkk@info.sgu.ru](mailto:ilinkk@info.sgu.ru)

Ильин Константин Кузьмич, доктор химических наук, профессор кафедры общей и неорганической химии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [ilinkk@info.sgu.ru](mailto:ilinkk@info.sgu.ru)

Визуально-политермическим методом в интервале 5–60°C исследованы фазовые равновесия и критические явления в смесях компонентов разреза 2 тетраэдра состава четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота, включающей тройную жидкостную систему с замкнутой бинадальной кривой. Впервые предложена методика, позволяющая найти координаты конечной точки критической ноды монотектического состояния в четверных системах соль–три растворителя. Изотермы фазовых состояний системы, построенные на плоскости треугольников разреза при двенадцати температурах, позволили выявить топологическую трансформацию фазовой диаграммы разреза тетраэдра состава с изменением температуры.

**Ключевые слова:** четверные системы соль–три растворителя, нитрат калия, пиридин, масляная кислота, топологическая трансформация фазовой диаграммы, равновесие жидкость–жидкость–твердое, равновесие жидкость–жидкость, визуально-политермический метод, высаливание, критическая нода монотектики.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-278-284

В экстракционной практике все большее применение находят нетрадиционные экстракционные тройные системы [1]. Они являются перспективными в процессах экстракции комплексных соединений металлов с целью их разделения и концентрирования [2–4]. Одним из главных достоинств таких систем является отсутствие среди компонентов легколетучих и горючих растворителей, что повышает безопасность их проведения и снижает экологическую нагрузку на окружающую среду. В этих системах в определенном

температурном интервале существует замкнутая область расслоения, возникновение которой Р. В. Мерцлин [5] и его последователи [6–8] связывают с химическим взаимодействием между компонентами одной из трех двойных пограничных систем. Введение солей-высаливателей в смеси компонентов таких систем способствует оптимизации экстракционного процесса за счет увеличения размеров объема двух жидких фаз.

Ранее нами [9] проведен обзор литературы по влиянию неорганических солей на фазовое поведение тройных систем с замкнутой областью расслоения. Установлено, что вопрос о топологической трансформации фазовой диаграммы возникающей четверной системы с изменением температуры остается малоизученным. Нами были исследованы фазовые равновесия и критические явления в двух четверных системах хлорид (нитрат) калия – вода – пиридин – масляная кислота, включающих тройную систему вода–пиридин–масляная кислота с замкнутой областью расслоения [9, 10], для выяснения топологической трансформации их фазовых диаграмм при изменении температуры. Установлено, что обе соли обладают высаливающим действием на водно-органические смеси. Сравнение полученных данных позволило сделать вывод о более слабом высаливающем действии нитрата калия по сравнению с хлоридом калия [10].

В четверной системе нитрат калия – вода – пиридин – масляная кислота был исследован один разрез тетраэдра состава, пересекающий только объемы фазовых состояний с наличием твердой фазы [10]. Настоящая работа посвящена политермическому изучению фазовых равновесий и критических явлений в смесях компонентов разреза 2 четверной системы нитрат калия – вода – пиридин – масляная кислота с целью выявления закономерностей топологической трансформации объемов двухжидкофазных состояний и линий критических точек в объеме тетраэдра состава с изменением температуры.

В четверную систему нитрат калия – вода – пиридин – масляная кислота входят четыре составляющих тройных системы: вода–пиридин–



масляная кислота, нитрат калия–вода–пиридин, нитрат калия–вода–масляная кислота, нитрат калия – пиридин – масляная кислота. Растворимость компонентов и фазовые равновесия в этих системах кратко охарактеризованы в [10].

### Материалы и методы

Используемые в работе растворители подвергали тщательной очистке, как описано в [11]. Растворители идентифицировали по температуре кипения, показателю преломления и плотности; их физические константы хорошо согласовались со справочными данными [12]. В работе использовали нитрат калия квалификации «ч.д.а.», дополнительно перекристаллизованный, тонко растертый и высушенный в вакууме над оксидом фосфора (V) при 100°C до постоянной массы. Отсутствие влаги в соли контролировали термogrавиметрическим анализом. Подготовленные препараты пиридина, масляной кислоты и соли хранили над прокаленным хлоридом кальция в эксикаторах, защищенных от прямого воздействия световых лучей.

Изучение фазовых равновесий в смесях компонентов четверной системы проводили визуально-политермическим методом [13], а составы растворов, соответствующие критическим точкам растворимости и критическим точкам критических нод, определяли методом отношения объемов жидких фаз [14]. Методика обработки результатов политермического исследования и построения изотермических фазовых диаграмм разреза четверной системы кратко изложена в [9]. Относительная погрешность определения составов смесей, отвечающих точкам фазовых переходов, составила  $\pm 0.5\%$ .

Фазовые равновесия и критические явления в смесях компонентов изучали по четырнадцати сечениям треугольника разреза 2 тетраэдра состава указанной четырехкомпонентной системы в интервале температур от 5 до 60°C. Разрез был проведен через ребро тетраэдра состава пиридин–масляная кислота и точку ребра вода–нитрат калия, отвечающую 25.00 мас.% соли (рис. 1). Выбор положения разреза определялся тем, чтобы он пересекал объемы жидкофазных состояний, а также объемы фазовых состояний с наличием твердой фазы. Кроме того, плоскость разреза должна пересечь критические ноды монотектических состояний и линию критических точек растворимости, проходящую по поверхности двухжидкофазного объема, что позволит выявить топологическую трансформацию этих фазовых состояний с изменением температуры.

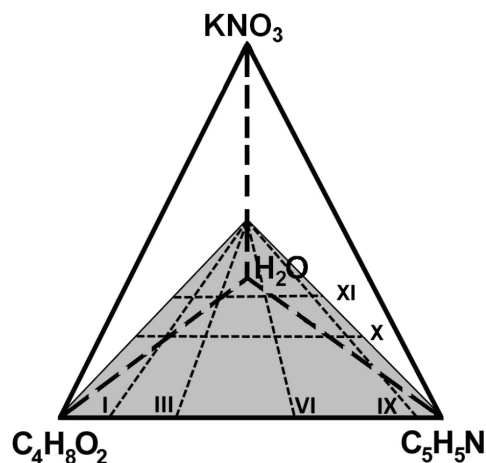


Рис. 1. Схематическое положение разреза 2 и сечений на плоскости разреза в тетраэдре состава четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота

### Результаты и их обсуждение

Четырехкомпонентные смеси по сечениям I–IX изучаемого разреза (см. рис. 1) характеризовались переменным содержанием смеси соли с водой указанного состава и постоянным для каждого сечения соотношением масс пиридина и масляной кислоты: 10:90(I), 20:80(II), 35:65(III), 50:50(IV), 65:35(V), 80:20(VI), 92:8(VII), 97:3(VIII), 99:1(IX). Смеси компонентов по сечениям X и XI треугольника разреза (см. рис. 1) характеризовались переменным соотношением масс пиридина и масляной кислоты и постоянным для каждого сечения содержанием смеси нитрата калия с водой: 50.00 мас.% (X), 65.00 мас.% (XI). В смесях компонентов осуществлялись следующие фазовые состояния: монотектическое равновесие  $\ell_1 + \ell_2 + S$ , насыщенные растворы  $\ell + S$ , расслоение  $\ell_1 + \ell_2$  и ненасыщенные растворы  $\ell$ . Твердая фаза (S) при всех температурах интервала исследования отвечала по составу индивидуальной соли (нитрат калия). В качестве примера на рис. 2 представлены политермы сечений VI, VII, X и XI. На сечении VI найдена критическая точка растворимости равновесия жидкость–жидкость (обозначена большим кружком и буквой К).

Для определения зависимостей составов смесей, отвечающих критическим точкам критической ноды  $K'S$  и критическим точкам растворимости  $K'$ , от температуры были исследованы смеси компонентов дополнительных сечений, характеризующиеся переменным содержанием смеси соли с водой указанного состава и постоянным для каждого сечения соотношением масс пиридина и масляной кислоты: 52.0:48.0, 58.0:42.0, 63.9:36.1, 66.5:33.5, 72.3:27.7, 73.6:26.4,

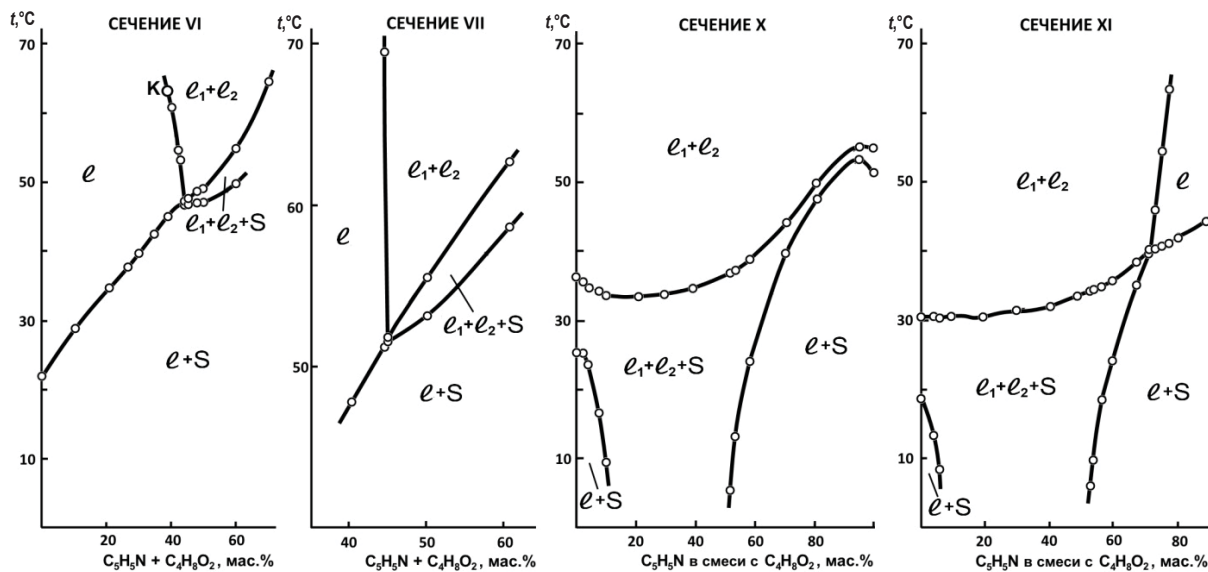


Рис. 2. Политермы фазовых состояний четверной системы нитрат калия – вода – пиридин – масляная кислота по сечениям VI, VII, X и XI разреза 2 тетраэдра состава

76.00:24.00. При политермическом изучении фазовых равновесий в смесях компонентов по сечениям II–IX и XI определяли координаты точек контакта четырех полей фазовых состояний  $l$ ,  $l+S$ ,  $l_1+l_2$ ,  $l_1+l_2+S$  (см. рис. 2). Используя полученные результаты, были построены зависимости содержания пиридина в смеси с масляной кислотой, а также смеси пиридина с масляной кислотой для четырехкомпонентных смесей (точки контакта) от температуры (рис. 3).

В этих координатах также построили зависимости содержания смеси пиридина и масляной кислоты, а также пиридина в смеси с масляной кислотой (см. рис. 3) в четырехкомпонентных смесях, отвечающих критической точке  $K'S$  критической ноды объема монотектического состояния  $l'_1+l'_2+S$  и критической точке растворимости  $K'$  области расслоения  $l'_1+l'_2$  (см. рис. 3, кривая  $K'S - K'(S) - K'$ , светлые кружки), от температуры. Построенные кривые имеют точку пересечения при  $43.6^\circ\text{C}$  (обозначена большим черным кружком и надписью  $K'(S)$ ), которая разделяет кривые критических точек, принадлежащих критической ноды  $K'S$  (кривая  $K'S - K'(S)$ ) и линии критических точек растворимости (кривая  $K'(S) - K'$ ). Таким образом, в интервале  $5.5\text{--}43.6^\circ\text{C}$  плоскость разреза пересекает поверхность, возникающую при движении критической ноды  $K'S$  в четырехмерной температурно-концентрационной призме изучаемой четверной системы.

Образующаяся в этой же призме поверхность критических точек растворимости  $K'$  будет пересекаться плоскостью разреза в интервале  $43.6\text{--}63.2^\circ\text{C}$ . Следовательно, при  $43.6^\circ\text{C}$  плос-

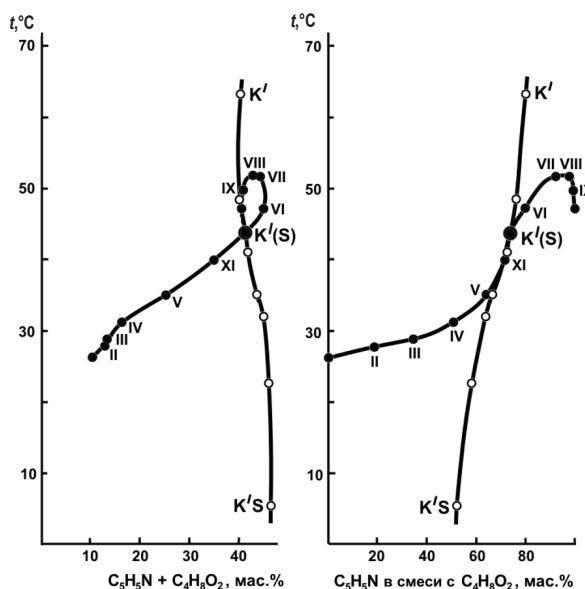


Рис. 3. Зависимости содержания смеси масляной кислоты и пиридина, а также пиридина в смеси с масляной кислотой в четырехкомпонентных смесях, отвечающих критической точке  $K'S$  критической ноды объема монотектического состояния  $l'_1+l'_2+S$  и критической точке растворимости  $K'$  области расслоения  $l'_1+l'_2$  (кривая  $K'S - K'(S) - K'$ , светлые кружки), точкам контакта четырех полей фазовых состояний по сечениям II–IX (черные кружки) от температуры в разрезе 2 тетраэдра состава четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота

кость разреза проходит через конечную точку критической ноды  $K'S$ . Построенные на рис. 3 зависимости позволили нам найти состав жидкой фазы (конечную точку) критической ноды монотектического состояния, а также температуру ее



появления в изучаемом разрезе. Таким образом, нами впервые предложена методика, позволяющая найти координаты жидкой фазы (конечную точку) критической ноды монотектического состояния в четверных системах.

Для определения зависимости составов смесей, отвечающих критическим точкам критической ноды  $K_1S$  монотектического состояния, от температуры были исследованы смеси компонентов двух дополнительных сечений, характеризующиеся переменным соотношением масс пиридина и масляной кислоты и постоянным для каждого сечения содержанием смеси нитрата калия с водой: 73.1 и 74.0 мас.%. Зависимости содержания смеси пиридина с масляной кислотой и пиридина в смеси с масляной кислотой в критических растворах, соответствующих критической ноде  $K_1S$ , от температуры представлены на рис. 4. Эти кривые начинаются при  $18.0^\circ\text{C}$  в точке, принадлежащей критической ноде монотектического состояния в тройной системе нитрат калия–вода–масляная кислота.

Результаты политермических исследований использовали для построения изотермических фазовых диаграмм разреза при двенадцати температурах:  $5.0, 18.0, 25.0, 26.2, 30.0, 35.0, 40.0, 43.6, 47.2, 50.0, 52.0$  и  $60.0^\circ\text{C}$  (рис. 5–9). Топологическая трансформация фазовой диаграммы разреза 2 в интервале  $5.0\text{--}22.0^\circ\text{C}$  (например, изотермы при  $5.0$  и  $18.0^\circ\text{C}$  на рис. 5) аналогична рассмотренной для разреза 1 [10], поскольку значение растворимости нитрата калия в этом интервале температур меньше 25 мас.% и разрез 2 пересекает в тетраэдре состава только объемы фазовых состояний с наличием твердой фазы ( $l+S, l'_1+l'_2+S$ ). С повышением температуры растворимость нитрата калия в воде возрастает и выше  $22.0^\circ\text{C}$  она больше 25 мас.% [15].

В температурно-концентрационной призме тройной системы нитрат калия–вода–масляная кислота, как показали наши исследования, выше  $18.0^\circ\text{C}$  (см. рис. 5) развивается объем монотектического состояния. Поэтому на изотерме разреза, например при  $25.0^\circ\text{C}$  (см. рис. 5), это отражается увеличением размеров поля монотектики  $l'_1+l'_2+S$ , которое примыкает к стороне треугольника состава, отвечающей системе нитрат калия–вода–масляная кислота. Кроме того, появляется небольшое поле гомогенных растворов  $l_2$ , примыкающее к вершине треугольника разреза ( $\text{KNO}_3+\text{H}_2\text{O}$ ). С повышением температуры размеры полей монотектики  $l'_1+l'_2+S$  и гомогенных растворов  $l_2$  увеличиваются, и при  $26.2^\circ\text{C}$  на изотерме разреза (см. рис. 5) происходит их контакт в точке (обозначена черным кружком) на стороне

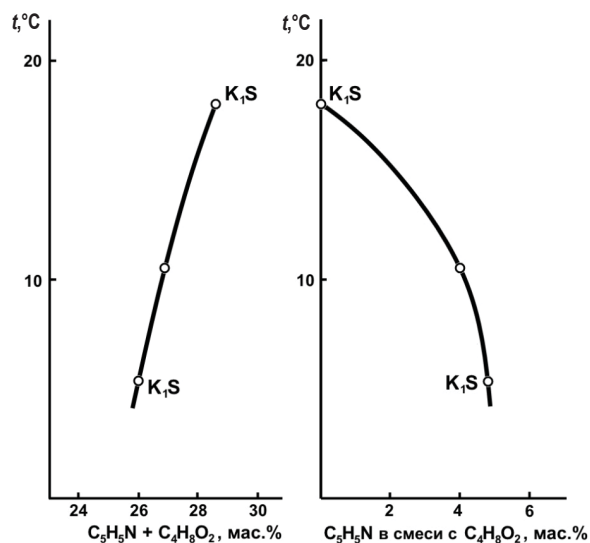


Рис. 4. Зависимости содержания смеси пиридина с масляной кислотой и пиридина в смеси с масляной кислотой в критических растворах, соответствующих критической ноды  $K_1S$  монотектического состояния, от температуры в разрезе 2 тетраэдра состава четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота

треугольника разреза ( $\text{KNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ ) –  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ . При этой температуре в плоскость разреза входит точка, соответствующая составу жидкой фазы  $l_2$  монотектического состояния в тройной системе нитрат калия–вода–масляная кислота. Поэтому на изотермах разреза при более высоких температурах (например, при  $30.0, 35.0$  и  $40.0^\circ\text{C}$ , см. рис. 6 и 7) появляется поле расслоения  $l'_1+l'_2$ . Оно контактирует одновременно с полями монотектики  $l'_1+l'_2+S$ , насыщенных  $l_2+S$  и гомогенных  $l_2$  растворов в одной точке (на изотермах обозначены зачерненным кружком).

С повышением температуры (см. рис. 6 и 7) размеры полей  $l'_1+l'_2$  и  $l_2$  увеличиваются, критическая точка  $K'S$  критической ноды монотектики приближается к точке контакта четырех полей (черный кружок). Из политермических данных (см. рис. 3) было установлено, что при  $43.6^\circ\text{C}$  плоскость разреза проходит через состав жидкой фазы (конечную точку) критической ноды  $K'S$ . Очевидно, при данной температуре точка контакта четырех полей фазовых состояний (черный кружок) сольется с критической точкой  $K'S$  критической ноды монотектики. На изотерме разреза при  $43.6^\circ\text{C}$  (см. рис. 7) эта точка обозначена как  $K'(S)$ .

При температурах, более высоких, чем  $43.6^\circ\text{C}$ , плоскость разреза пересекает линию критических точек растворимости  $K'$ , проходящую по поверхности двухжидкофазного объема. Например, на изотерме разреза при  $47.2^\circ\text{C}$

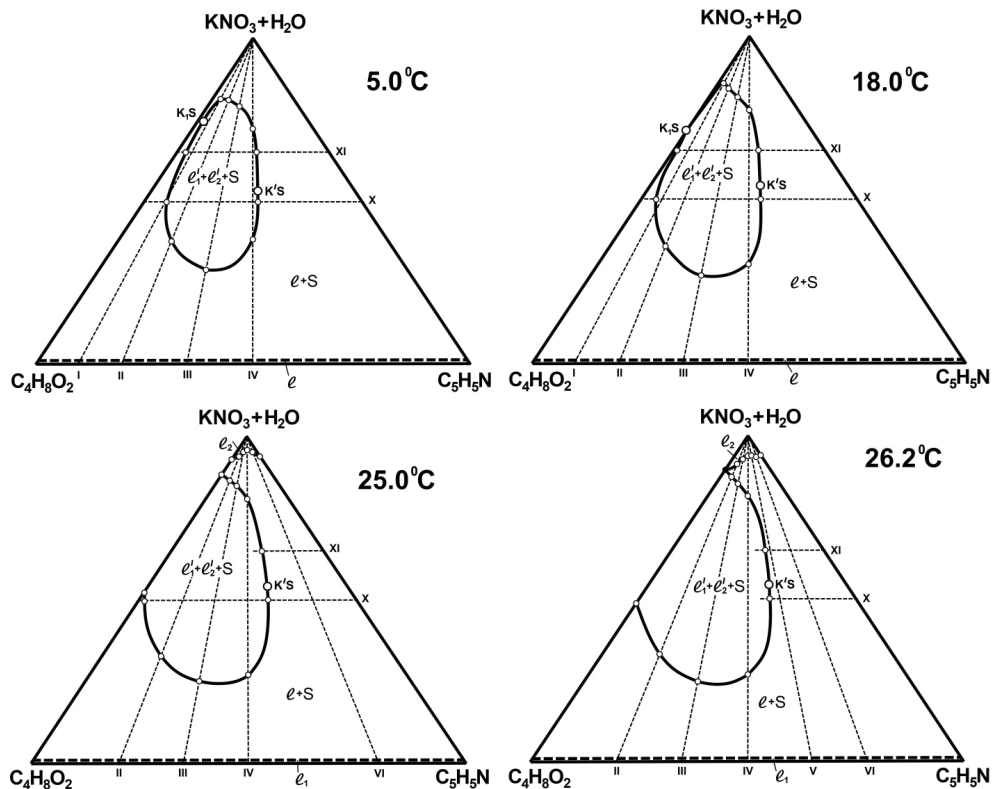


Рис. 5. Изотермы фазовых состояний четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота в разрезе 2 при 5,0, 18,0, 25,0 и 26,2 °С

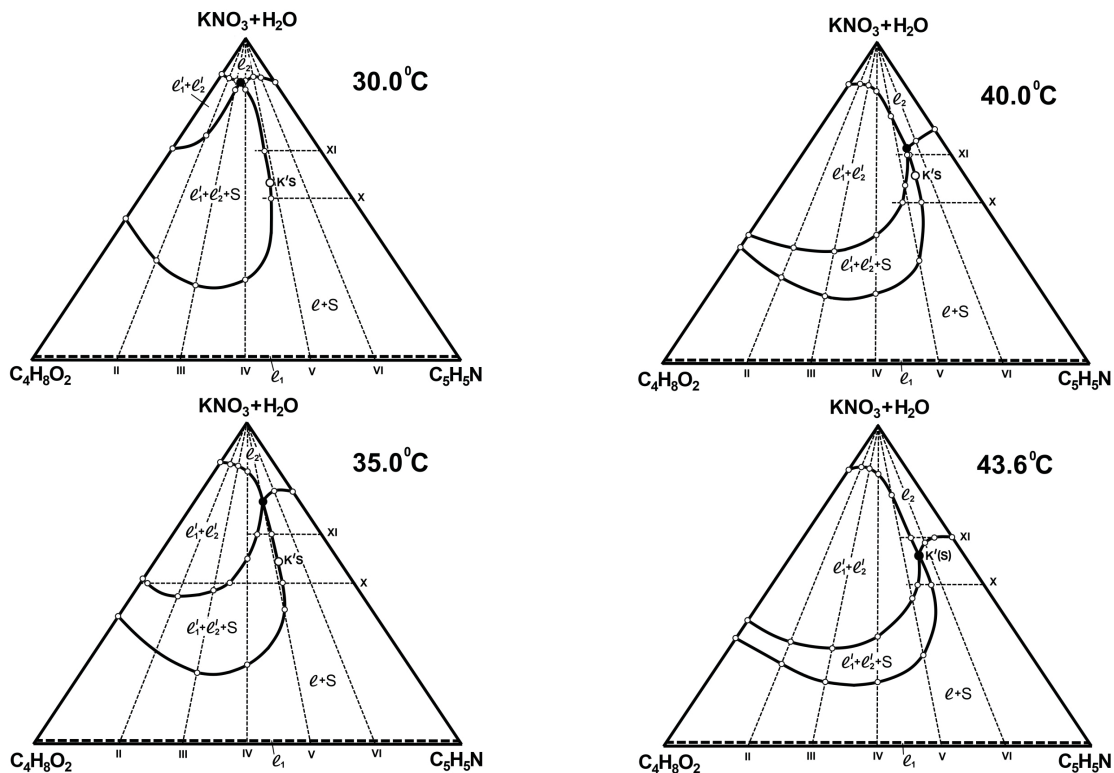


Рис. 6. Изотермы фазовых состояний четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота в разрезе 2 при 30,0 и 35,0 °С

Рис. 7. Изотермы фазовых состояний четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота в разрезе 2 при 40,0 и 43,6 °С



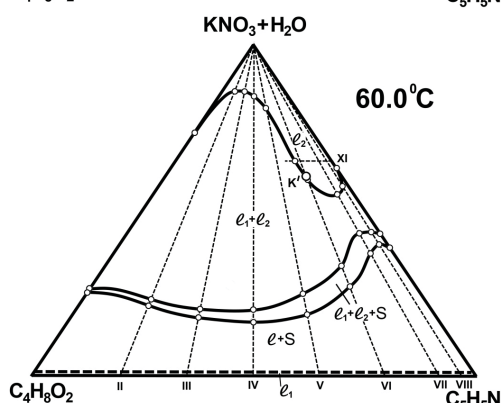
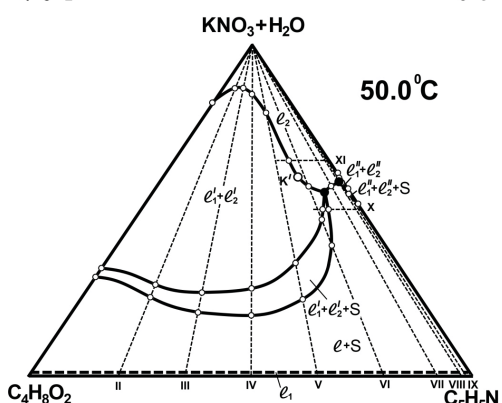
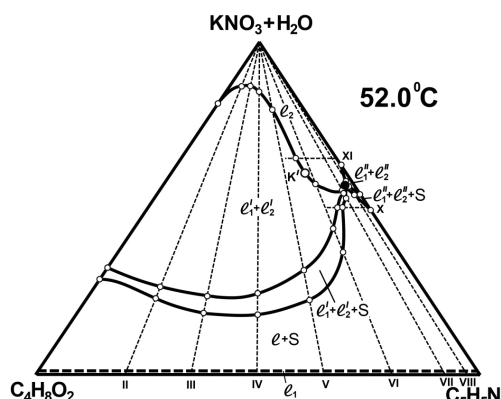
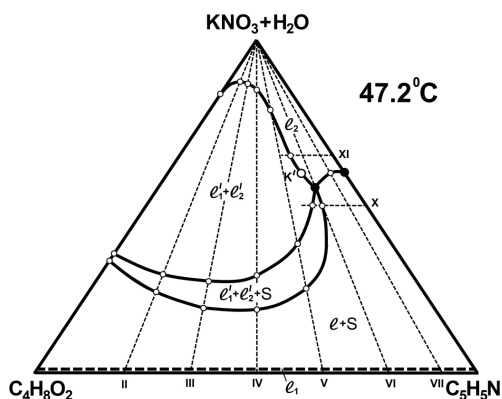


Рис. 8. Изотермы фазовых состояний четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота в разрезе 2 при 47.2 и 50.0°C

Рис. 9. Изотермы фазовых состояний четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота в разрезе 2 при 52.0 и 60.0°C

(см. рис. 8), на линии фазового перехода  $l_1'+l_2'Dl_2$  существует критическая точка растворимости  $K'$ . При этой температуре на диаграмме изученной нами тройной системы нитрат калия–вода–пиридин существует монотектический треугольник  $l_1+l_2+S$  с примыкающими к нему полями насыщенных растворов  $l+S$  и двухжидкофазного состояния  $l_1+l_2$ .

При 47.2°C в плоскость исследуемого разреза входит точка контакта четырех полей фазовых состояний (гомогенного, насыщенного, расслоения и монотектики), которая обозначена черным кружком на стороне треугольника разреза ( $KNO_3 + H_2O$ ) –  $C_5H_5N$ . С повышением температуры на фазовой диаграмме этой тройной системы увеличиваются размеры полей расслоения и монотектики вследствие возрастания высаливающего действия нитрата калия на водные растворы пиридина. В результате на изотерме разреза при 50.0°C (см. рис. 8) появляются небольшие поля двух новых фазовых состояний – двухжидкофазного  $l_1''+l_2''$  и монотектического  $l_1''+l_2''+S$ .

С дальнейшим повышением температуры объемы монотектики и двухжидкофазного состоя-

ния, примыкающие к грани тетраэдра состава нитрат калия–вода–пиридин, продвигаются вглубь тетраэдра. В результате увеличиваются размеры полей фазовых состояний  $l_1''+l_2''$  и  $l_1''+l_2''+S$  на плоскости разреза (изотерма при 52.0°C, см. рис. 9), и две точки контакта четырех полей фазовых состояний сливаются в единую точку (обозначена черным кружком).

С повышением температуры объемы монотектик  $l_1'+l_2'+S$  и  $l_1''+l_2''+S$ , а также двухжидкофазных состояний  $l_1'+l_2'$  и  $l_1''+l_2''$  объединяются внутри тетраэдра состава, что отражается на изотермической диаграмме разреза при 60.0°C образованием полей  $l_1+l_2+S$  и  $l_1+l_2$  (см. рис. 9).

Таким образом, анализ и обобщение полученных результатов позволили выявить картину топологической трансформации фазовой диаграммы изученного разреза четверной системы нитрат калия–вода–пиридин–масляная кислота при изменении температуры, а также подтвердить фрагмент варианта ранее предложенной схемы топологической трансформации фазовых диаграмм четверных систем соль–три растворителя, включающей тройную жидкостную систему с замкнутой областью расслоения.



## Список литературы

1. Яковлева Т. П., Леснов А. Е., Петров Б. И., Денисова С. А. Жидкофазные и экстракционные равновесия в нетрадиционных экстракционных системах, содержащих производные пиразолона // Избранные главы физико-химического анализа : в 2 ч. Пермь : Перм. ун-т, 2003. Ч. 1. С. 135–171.
2. Петров Б. И., Афендикова Г. Ю. Об устранении основного недостатка процессов жидкостной экстракции неорганических соединений // Журн. прикл. химии. 1985. Т. 85, № 10. С. 2194–2199.
3. Петров Б. И., Яковлева Т. П., Чукин В. М., Егорова Л. С. Образование новых экстракционных систем при протолитическом взаимодействии и высаливании органических соединений // Журн. прикл. химии. 1993. Т. 66, № 8. С. 1751–1756.
4. Петров Б. И., Пригожин С. И. Аналитическое использование экстракции элементов в расслаивающейся системе вода–антипирин–монохлоруксусная кислота // Журн. аналит. химии. 1985. Т. 40, № 2. С. 247–251.
5. Мерцлин Р. В. О системах с верхней тройной критической точкой // Журн. общ. химии. 1936. Т. 6, № 12. С. 1828–1840.
6. Журавлев Е. Ф. О системах с нижней тройной критической точкой // Журн. общ. химии. 1959. Т. 29, № 10. С. 3178–3183.
7. Крупаткин И. Л., Роженцова П. О. О поведении двойных скрытно-расслаивающихся систем в тройных системах // Журн. физ. химии. 1970. Т. 44, № 4. С. 1036–1039.
8. Сергеева В. Ф., Матюшинская Л. Б. Равновесие жидкость–жидкость в системах вода–изомасляная кислота–пиридин (2-метилпиридин, 2,4-диметилпиридин, 2,4,6-триметилпиридин) // Журн. общ. химии. 1977. Т. 47, № 6. С. 1215–1218.
9. Черкасов Д. Г. Фазовые равновесия и критические явления в разрезе 1 четверной системы вода – пиридин – масляная кислота – хлорид калия // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2008. Т. 8, вып. 2. С. 28–36.
10. Черкасов Д. Г., Чепурина З. В., Курский В. Ф., Ильин К. К. Топологическая трансформация фазовой диаграммы разреза 1 тетраэдра состава четверной системы нитрат калия – вода – пиридин – масляная кислота в интервале 5–60°C // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 3. С. 262–269.
11. Черкасов Д. Г., Смотров М. П., Ильин К. К. Равновесие двух жидких фаз и критические явления в тройной системе вода – пиридин – масляная кислота в интервале 5–55°C // Журн. прикл. химии. 2008. Т. 81, № 2. С. 229–233.
12. Химическая энциклопедия : в 5 т. / ред. И. Л. Кнунянц. М. : Сов. энцикл., 1988–1998.
13. Аносов В. Я., Озерова М. И., Фиалков Ю. Я. Основы физико-химического анализа М. : Наука, 1976. 504 с.
14. Трейбал Р. Жидкостная экстракция : пер. с англ. / под ред. С. З. Кагана. М. : Химия, 1966. 724 с.
15. Справочник по растворимости : бинарные системы : в 2 т. / под ред. В. В. Кафарова. Т. 1 : в 2 кн. Кн. 1. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1961. 860 с.

### Topological Transformation of Phase Diagram for Cut 2 of the Composition Tetrahedron of the Quaternary Potassium Nitrate – Water – Pyridine – Butyric Acid System within 5–60°C

D. G. Cherkasov, Z. V. Chepurina, K. K. Il'in

Dmitry G. Cherkasov, ORCID 0000-0002-6862-1917, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilinkk@info.sgu.ru

Zinaida V. Chepurina, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilinkk@info.sgu.ru

Konstantin K. Il'in, ORCID 0000-0002-8359-8874, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilinkk@info.sgu.ru

Phase equilibria and critical phenomena in component mixtures of the cut 2 of the composition tetrahedron of the quaternary system potassium nitrate + water + pyridine + butyric acid whose constituent ternary liquid system had a closed binodal curve were studied by means of the visual-polythermal method within 5–60°C. We first proposed a method to find the coordinates of the end point of the critical tie line of monotectic state in quaternary systems salt + three solvents. Phase state isotherms constructed on the triangles of the cut for twelve temperatures have allowed the topological transformation of the phase diagram for the examined cut of the composition tetrahedron with temperature changes to be revealed.

**Key words:** quaternary system salt + three solvent, potassium nitrate, pyridine, butyric acid, topological transformation of phase diagram, equilibrium liquid–liquid–solid, equilibrium liquid–liquid, visual-polythermal method, salting-out, critical tie line of monotectic.

## Образец для цитирования:

Черкасов Д. Г., Чепурина З. В., Ильин К. К. Топологическая трансформация фазовой диаграммы разреза 2 тетраэдра состава четверной системы нитрат калия – вода – пиридин – масляная кислота в интервале 5–60°C // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 278–284. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-278-284

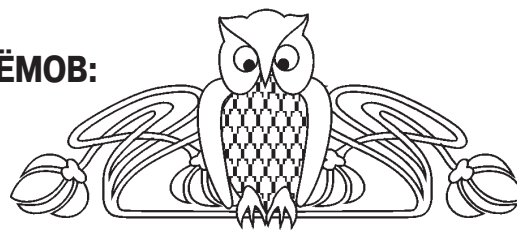
## Cite this article as:

Cherkasov D. G., Chepurina Z. V., Il'in K. K. Topological Transformation of Phase Diagram for Cut 2 of the Composition Tetrahedron of the Quaternary Potassium Nitrate – Water – Pyridine – Butyric Acid System within 5–60°C. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 278–284 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-278-284



УДК [691.175.5/8+533.583]:665.61

## ПОЛИМЕРНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ СБОРА НЕФТЕПРОДУКТОВ С ПОВЕРХНОСТИ ВОДОЁМОВ: ОБЗОР РУССКОЯЗЫЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ЗА 2000–2017 ГГ. (ЧАСТЬ 3)



Т. А. Байбурдов, А. Б. Шиповская

Байбурдов Тельман Андреевич, кандидат химических наук, доцент кафедры полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ» Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, директор ООО «АКРИПОЛ», Саратов, bta@acrypol.ru

Шиповская Анна Борисовна, доктор химических наук, заведующий кафедрой полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ» Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, shipovskayaab@yandex.ru

Осуществлен поиск и проведён анализ научной, патентной и научно-технической литературы на русском языке за 2000–2017 гг., посвящённой проблемам разработки и практического применения полимерных сорбентов для сбора разливов нефти и нефтепродуктов с поверхности водоёмов, а также очистки водных сред. Рассмотрены промышленно выпускаемые в РФ полимерные нефтесорбенты. Проанализированы научные исследования в области наиболее перспективных полимерных материалов с высокой сорбционной способностью к углеводородам. Выделены основные классы современных полимерных сорбционных материалов, даны характеристики предлагаемых нефтесорбентов. Оценена перспективность применения полимерных сорбентов указанных классов для очистки поверхностей водоёмов от нефтяных разливов.

**Ключевые слова:** полимер, сорбент, нефть, углеводороды.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-285-298

(Часть 1, 2. Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 1. С. 36–44; вып. 2. С. 145–153).

Одним из интенсивных источников загрязнения окружающей среды является нефтедобывающая и нефтеперерабатывающая отрасли промышленности. Загрязнение воды нефтепродуктами происходит как при добыче и транспортировке нефти, так и при ее переработке. Вследствие низкой растворимости в воде накопление нефти и нефтепродуктов происходит в первую очередь на поверхности водоёмов. В этой связи ликвидация разливов нефти и нефтепродуктов с поверхности водоёмов занимает особое место в экологической защите населения и охране окружающей природной среды.

К настоящему времени для очистки воды от нефти и нефтепродуктов используют различные методы, среди которых наиболее перспективны

сорбционные методы с использованием сорбентов на основе полимерного сырья синтетического, искусственного и природного происхождения. Основными требованиями, предъявляемыми к полимерным сорбентам, позволяющим при минимальных затратах максимально эффективно ликвидировать последствия разливов нефти и нефтепродуктов на акваториях и избежать экологической катастрофы [1–3], являются: гидрофобность, высокая нефтеёмкость, плавучесть (способность удерживаться на поверхности воды), способность к удерживанию нефти при удалении сорбента с акватории, легкость утилизации или биоразлагаемость, устойчивость к разрушению в водной среде, возможность многократной регенерации, простота эксплуатации, эффективность работы в широком диапазоне температур, нетоксичность и оптимальная стоимость.

В обзоре [4] систематизированы литературные источники до 2004 г. по адсорбентам, используемым для ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов на водной поверхности. Наибольшее распространение на данный период получили материалы на основе пенополиуретанов, микробаллонов терморезистивных смол, нетканых волокнистых материалов из полиэтилен-полипропиленовых термопластов, волокнистых носителей из смеси алкилкарбонных соединений с полибутадиеном либо окисленных целлюлозосодержащих продуктов. Для удешевления производства сорбентов в их состав предложено вводить отходы льнопроизводства, хлопкового прядильного производства и др.

В обзорной работе [5] рассмотрены особенности процессов очистки воды от нефти и нефтепродуктов полимерными сорбентами на основе пенополистирола (гранулы, волокно), измельченных шин, каучуковой крошки, карбамидоформальдегидной (куски, порошок) и фенолформальдегидной смолы (порошок), поролон (листовой, гранулированный), синтепона, лавсана (волокно). Показано влияние на эффективность удаления нефтепродуктов из природных и сточных вод свойств и структуры этих материалов.

В настоящей работе приведен обзор полимерных нефтесорбентов, разработанных и ис-



следуемых в РФ в последние 15 лет. Рассмотрим сначала коммерчески доступные полимерные сорбенты, предназначенные для сбора нефти и нефтепродуктов с поверхности водоемов.

#### **Сорбенты на основе вспененных карбаминоформальдегидных смол**

Приведенный в работе [6] анализ российского рынка сорбционных материалов нефте-

продуктов показал, что среди полимерных сорбентов первое место занимает «Униполимер-М», второе – «Униполимер-Био» [7] (рис. 1). Они изготовлены из вспененных (карбаминоформальдегидных смол с включением добавок различной химической природы (разработка ООО НПП «Сибэксорб СФУ» Сибирского федерального университета г. Красноярск).

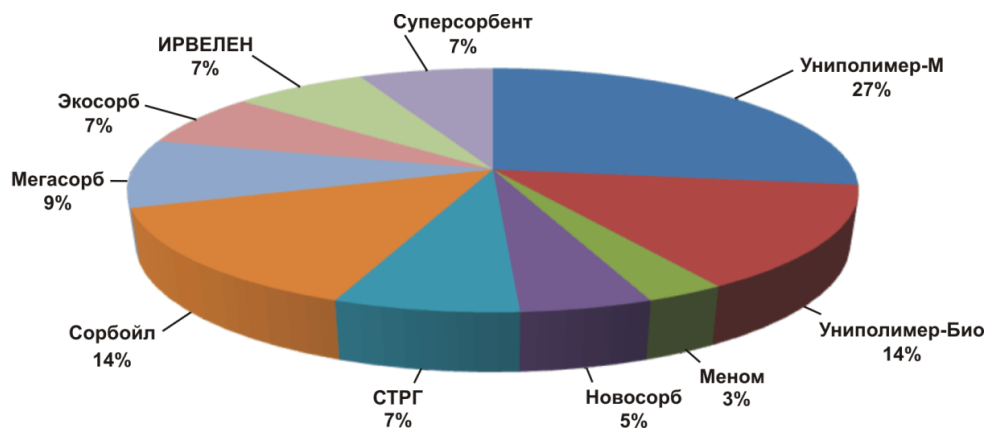


Рис. 1. Диаграмма структуры рыночных долей основных видов сорбентов нефтепродуктов на российском рынке [6]

Сорбент «Униполимер-М» производится в соответствии с технологией, защищенной патентами РФ [8, 9]. Включен в региональную целевую программу «Аварийный запас 2016–2020 гг.», под руководством Сибирского и Северо-Западного региональных Центров МЧС. Развитая пористая поверхность сорбента позволяет за короткое время поглощать значительное количество нефти и нефтепродуктов, устраняя возможность расширения масштабов загрязнения. Степень очистки воды от нефти составляет 98–99.5%, сорбционная емкость – 43–67 г/г (г нефтепродукта на г сорбента), скорость сорбции – 0.8–1.5 мм нефти/с. Отработанный сорбент удаляют с обрабатываемой поверхности и транспортируют на утилизацию или подают к отжимному устройству (возможно отделение до 95–97% нефти и нефтепродуктов). Результаты исследования физико-химических свойств, в частности гидрофильности, полимерного композита «Униполимер-М» в нативной и прессованной формах, приведены в [10, 11]. Данный сорбент способен к самостоятельному разложению в природных условиях и может рассматриваться в качестве эффективного средства для рекультивации земель [12, 13].

Биоокисляющий сорбент «Униполимер-Био» представляет собой комплексный биопрепарат на основе сорбента «Униполимер-М» и закрепленных в его порах нефтеокисляющих культур

микроорганизмов. Легко внедряется в толщу нефтяного слоя, существенно снижает продолжительность детоксикации нефти, предотвращает вымывание микроорганизмов из мест обработки, поддерживает водный баланс. Активность в разрушении нефти биосорбентом складывается из трёх основных компонентов: биодеструкции (40–60% активности, в зависимости от температуры, аэрации, типа нефти и пр.), физико-химических факторов (10–18%) и природных процессов самоочищения (20–30% активности).

В статье [14] приведены результаты научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по созданию и внедрению в производство нефтепоглощающих полимерных сорбентов серий «Униполимер-М», «Униполимер-Био», а также композиционного многофункционального препарата «Меном». Показана эффективность их использования для локализации проливов нефти на водных поверхностях и болотах; глубокой очистки воды и промышленных стоков от нефтепродуктов на промышленных очистных сооружениях, в том числе автомоечных узлах и пропарочных станциях, нефтебазах и ремонтных предприятиях; для быстрого поглощения и нейтрализации проливов легковоспламеняющихся и легкоиспаряющихся токсичных жидкостей. Исследуемые материалы не вызывают нарушения экологического равновесия в экосистемах и



не оказывают отрицательного воздействия на биотипы различного трофического уровня.

#### Волокнистые *Melt Blowing* материалы

В настоящее время в качестве высокоэффективных адсорбентов нефти и нефтепродуктов все более широкое применение находят синтетические волокнистые материалы, полученные методом распыления расплава полимера газовым потоком (*Melt Blowing*) [15, 16]. В качестве сырья используют гранулированный полиэтилен, полипропилен, полиэтилентерефталат, а также вторичные термопласты, полученные путем утилизации пластиковых бутылок, одноразовых шприцев, пакетов, посуды и др. Такие материалы представляют собой волокнистую массу из когезивно скрепленных в местах контакта полимерных волокон. Когезионные контакты между волокнами позволяют исключить использование в производстве таких материалов дополнительных процессов иглопробивания, сшивания и т.п. Технология *Melt Blowing* позволяет придавать сорбирующим элементам формоустойчивость и конструктивную определенность.

Основными параметрами *Melt Blowing* материалов, определяющими их сорбционные характеристики, являются плотность и диаметр волокон, которые варьируют в пределах 0.05–0.5 г/см<sup>3</sup> и 5–500 мкм соответственно (рис. 2) [15]. Другими характерными свойствами являются высокая адсорбционная способность к нефти и нефтепродуктам, большой объем пустот между волокнами, проницаемость для жидкостей и газов. Нефтеудерживающая способность данных сорбентов в статических условиях достигает более 30 г/г, значительно превосходя по этому параметру предназначенные для сбора нефтепродуктов традиционные композиционные материалы. Изготовленные в виде рулонов, шлангов, плавающих подушек они могут служить для удаления нефти с поверхности воды, защиты берегов водоемов и сбора вытекших нефтепродуктов при аварийных ситуациях на предприятиях и транспорте. Данные сорбенты обладают высокой способностью к регенерации без значительной потери сорбционной емкости при последующих применениях.

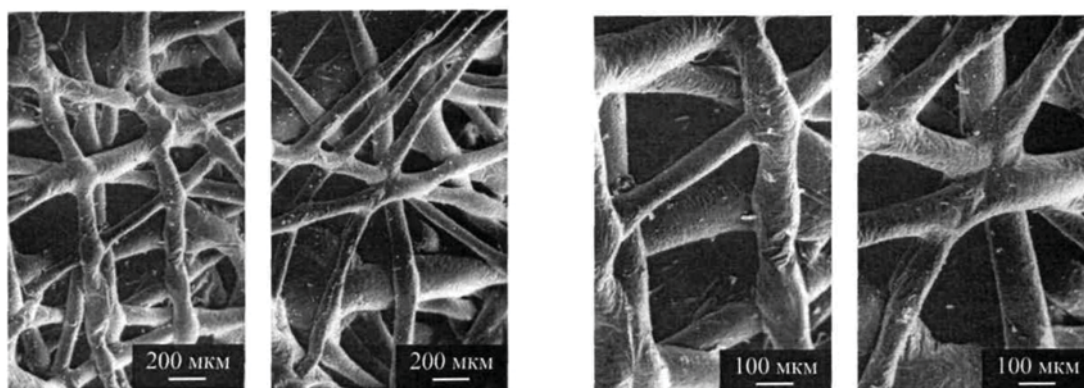


Рис. 2. Электронно-микроскопические изображения разных участков срезов полимерного волокнистого *Melt Blowing* материала [15]

По технологии *Melt Blowing* в Томском государственном архитектурно-строительном университете (ТГАСУ) разработан высокоэффективный волокнистый сорбент на основе товарного полипропилена, полиэтилентерефталата либо отходов изделий из данных полимеров [17]. Описание технологической линии по производству сорбента и исследование его нефтесорбционных свойств приведены в [18]. Сорбент представляет собой тонковолокнистую ватоподобную массу с диаметром волокна 100–250 мкм, насыпной плотностью 110–180 кг/м и порозностью 81–81.5%. Для сорбента на основе полипропилена поглощательная емкость по сбору нефтепродуктов в режиме промокания составляет 7.0–22.0 г/г, сорбционная

способность по сбору нефтепродуктов в режиме безнапорной фильтрации 5.0–9.0 г/г, на основе полиэтилентерефталата – 8.0–13.0 г/г и 3.0–9.0 г/г соответственно. Материал регенируемый, его свойства полностью восстанавливаются после механического отжима, который можно повторять до 50 раз. Он намного легче воды и характеризуется высокой плавучестью. Его можно применять при температурах ниже нуля. Исследования эффективности использования волокнистых *Melt Blowing* сорбентов для сбора нефти и нефтепродуктов с водных и грунтовых поверхностей описаны в работе [19].

Данному полимерному сорбенту присвоен товарный знак «ИРВЕЛЕН». Производство орга-



низовано на фирме Microfaser-Repco GmbH (Германия, г. Гифхорн). В РФ продается под товарным знаком «ИРВЕЛЕН-М марка 1», «ИРВЕЛЕН-М марка 2» и «ИРВЕЛЕН-М (М)» [20]. Занимает 7% отечественного рынка нефтесорбентов (см. рис. 1).

#### **Микрогелевые полисахаридсодержащие материалы**

ООО «НПО БиоМикроГели» выпускает запатентованный продукт БиоМикроГель®, переводящий находящиеся в воде нефтепродукты из стандартного в «желеобразное» состояние, предотвращая их растекание и воспламенение [21]. Разработка запатентована как в РФ [22], так и за рубежом [23]. Сорбент БиоМикроГель® предназначен для обработки загрязнений от нефти или нефтепродуктов и может быть использован для сбора пленок нефти, масел, мазута, топлив и углеводородов с целью очистки поверхности воды и водных потоков.

Согласно изобретению [22, 23] «микрогели» представляют собой дисперсии полимерных коллоидных частиц диаметром 0.01–1 мкм, способных набухать в жидкой среде вследствие электростатического или стерического отталкивания между заряженными группами, стабилизированные поверхностно-активными веществами (ПАВ). Используют коллоидные растворы природных полисахаридов и их производных: низкозамещенную (<40%) карбоксиметилцеллюлозу и ее соли с алифатическими аминами (бутиламин, бензиламин, этилендиамин, гексаметилендиамин); хитозан со степенью деацетилирования 90–97%; пектиновые вещества с остаточным количеством метоксигрупп <25%. Молекулярная масса продуктов варьируется в пределах 20–200 кДа, при этом высокомолекулярные (> 200 кДа) и низкомолекулярные (< 20 кДа) производные полисахаридов не применимы для данной технологии. «Микрогели» полисахаридов получают путем физической ассоциации или химической сшивки с использованием ангидридов и активированных эфиров дикарбоновых кислот, диизоцианидов, диизоцианатов и других сшивающих агентов. В качестве ПАВ используют биоразлагаемые соединения, что обеспечивает экологическую безопасность данной технологии.

Смесь «микрогелей» полисахаридов с ПАВ образует устойчивую пену, при нанесении которой на поверхность водной среды с нефтью или нефтепродуктами происходит «капсулирование» нефтяной пленки на поверхности раздела фаз с формированием «желеобразной» массы, пригодной для механического извлечения с поверхности воды.

Перейдем теперь к рассмотрению научных исследований в области наиболее перспективных полимерных нефтесорбентов.

#### **Пенополимерные сорбенты**

Пористые полимерные сорбенты находят широкое применение для сбора нефти и нефтепродуктов, поскольку производятся в промышленных масштабах и часто являются отходами производства. Открытая ячеистая структура и высокая олеофильность материалов обеспечивают эффективность их использования в качестве нефтепоглотителей. Типичными представителями таких сорбентов служат поролон, карбамидные пенопласты, материалы на основе полиуретановой пены и др. [24–26]. Такие материалы способны поглощать порядка 50 г нефти на 1 г сорбента, характеризуются высокой скоростью сорбции, плавучестью после сбора нефти. Отличительная особенность данных сорбентов – возможность регулирования ячеистой структуры в широком диапазоне в процессе получения.

Сорбционные особенности пенополимерных сорбентов на основе различных типов индивидуальных полимеров и их смесей подробно рассмотрены в [27]. Показана принципиальная возможность регулирования процесса сорбции нефти и нефтепродуктов с водной и грунтовой поверхности в зависимости от объемной массы, морфологических особенностей макроструктуры сорбентов на основе пенополиолефинов, пенополивинилхлорида, пенополистирола, ударопрочного полистирола, пенополиамида, пенополиуретана, а также на основе смесей полиамида с полимерами стирола, смесей полиэтилена, полистирола и ударопрочного полистирола, смесей полиэтилена и акрилонитрил-бутадиен-стирольных (АБС) пластиков. Разработанные сорбенты отличаются высокой селективностью по нефти и нефтепродуктам, технологичностью применения в аварийных условиях, возможностью их оперативного сбора с водной и грунтовой поверхности от отделения от нефтепродуктов, а также способностью к многократной регенерации.

В работе [28] пенополимерные сорбенты получали на основе вторичного полипропилена с индексом расплава 4.2 г/10 мин. Для вспенивания полимера в полимерную композицию вводили 5% азодикарбонамида (газообразователя) и 0.5% стеарата цинка. Для сшивания полимерной матрицы использовали 1.0% пероксида дикумила, а для увеличения гидрофобности 3% нефтяного битума. Пеноматериалы получали экструзией при температуре 170–200°C. Сорбенты представляли собой газонаполненные, сшитые, гидрофобные материалы с закрытой ячеистой макроструктурой



и объемной массой от 30 до 510 кг/м<sup>3</sup>. Установлено, что процесс сорбции нефти протекает избирательно и в значительной степени зависит от объемной массы сорбента и размера ячейки. Наибольшая сорбционная емкость зафиксирована для сорбентов с объемной массой 25 кг/м<sup>3</sup> и средним диаметром ячейки 0.9–1.0 мм. С увеличением объемной массы сорбента (30–510 кг/м<sup>3</sup>) сорбционная емкость понижается. В то же время с повышением содержания нефти в составе очищаемого субстрата от 15 до 50 мас.% сорбционная емкость сорбентов возрастает. Показано также, что максимальная сорбционная емкость 7.7 г/г по дизельному топливу достигается на сорбентах с объемной массой 510 кг/м<sup>3</sup>. Для компрессорного и трансформаторного масел максимальная сорбционная емкость 7.9–8.0 г/г реализуется на сорбентах с объемной массой 320 кг/м<sup>3</sup>.

В работах [29, 30] дана классификация пенополимерных нефтяных сорбентов по 14 основным признакам, приведены результаты оценки критериев, определяющих качество и эффективность использования пенополимерных сорбентов в процессе локализации и ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов. Для выработки эффективного комплекса мероприятий, направленных на локализацию и ликвидацию аварийных разливов определены базовые критерии выбора пенополимерных сорбентов. Дано подробное описание этих критериев с учетом специфики сорбционных процессов на водной поверхности.

Авторы [31] получили нефтяной сорбент на основе пенополиуретана и шелухи гречихи без использования предварительной обработки последней. В ходе опытов выявлено, что открытопористая структура эластичного пенополиуретана позволяет сорбировать большое количество нефти и нефтепродуктов. Нефтеемкость сорбента в условиях тонкой пленки нефти на поверхности воды составляет 5–7.5 г/г, чистой нефти – 5–8 г/г. Получение сорбента предполагается в двух вариантах: в стационарных условиях и на мобильных установках в режиме чрезвычайных ситуаций в виде матов или бонов, а также в виде крошки, что предпочтительнее.

Авторами [5] получен древесно-полистирольный волокнистый материал для сбора нефти и нефтепродуктов, содержащий в качестве наполнителя окорку осины (10–60 мас.% фракции 0.5–1.0 мм). В качестве полимерного компонента для приготовления сорбента использовали гранулы (диаметр ~1 мм) вспененного полистирола и крошку (~3–5 мм) бытовых отходов полистирольного пенопласта. Формирование волокнистых композитов проводили взрывным автогидролизом

смеси вспененного полистирола и окорки осины при достаточно мягких условиях (температура 130°C, время 60 с, давление 3 МПа) без применения связующих. Исследовано влияние содержания древесного наполнителя на емкость сорбентов по нефти и нефтепродуктам в широком интервале температур [32]. Установлено, что значения нефтеемкости древесно-полистирольных волокнистых сорбентов с содержанием до 35–40 мас.% окорки осины превышает нефтеемкость чистого волокна полистирола, полученного в идентичных условиях. Максимальное значение нефтеемкости составляет 8.5–9.5 г/г. Таким образом, по количеству собранной нефти разработанный древесно-полистирольный сорбент не уступает ряду промышленных волокнистых нефтесобирателей.

Авторами [33] разработан дисперсный сорбент на основе пенополиуретана и отходов зерновых производств, позволяющий проводить ликвидацию углеводородных загрязнений с водных поверхностей. Исследовано влияние формы и размера зерна крошки сорбента на поглощающую способность по отношению к нефтепродуктам и нефти различных месторождений. Показано, что оптимальной поглощающей способностью ~16 г/г в сочетании с «плавучестью» обладает сорбент с размером зерна крошки ~0.125 см<sup>3</sup>. Полуужесткая структура обуславливает многократность (до 10 циклов) использования сорбента с регенерацией поглощенного продукта путем отжатия до 70–80 мас.%.

#### **Материалы на основе переработки вторичных полимеров**

В работе [34] проведено исследование использования полимерных материалов, синтезированных в лабораторных условиях на основе промышленных образцов каучуков (СКС, ДССК, СКН-26) в результате окислительного хлорфосфорилирования [35], в качестве сорбентов для удаления тонких нефтяных пленок. Модификация каучуков указанным способом приводит к образованию объемно-пористых продуктов с сорбционной емкостью: 0.34–0.49 г/г (СКС), 0.35–0.45 г/г (ДССК), 0.34–0.42 г/г (СКН-26). Полученные модификаты гидрофобны и обладают хорошей плавучестью после сорбции нефти.

Авторы [36] изучали сорбционные свойства материала на основе вторичного полиэтилентерефталата, получаемого осаждением полимера из его раствора в бензиловом спирте с добавкой дибутилфталата (пластификатора). Сорбционный материал представлял собой мелкодисперсный порошок. Установлено, что сорбент обладает



высокой эффективностью очистки воды от нефтепродуктов (99%) и ионов тяжелых металлов ( $\text{Cu}^{2+} = 85\%$ ,  $\text{Pb}^{2+} = 58\%$ ). Достаточная масса сорбента для очистки воды от нефтепродуктов составляет 0.5 г/100 мл.

В [37] рассмотрены новые типы пенополимерных сорбентов, полученных механохимическим синтезом при температуре 413–483 К из смеси вторичного полиэтилена с АБС-сополимером. В качестве модификаторов экструзии использовали 5% азодикарбонамида (порофор), 1% пероксида дикумила (сшивающий агент), 0.5% стеарата цинка (улучшитель текучести расплава), 5% графт-сополимера полиэтилена с сополимером стирола и акрилонитрила (компатибилизатор), а также 3–5% нефтяного битума (гидрофобизатор). Установлено, что сорбенты способны к селективному сбору нефти и нефтепродуктов с водной поверхности. Максимальное значение сорбционной емкости: 30.6 г/г (нефть), 25.2 г/г (дизельное топливо), 20.0 г/г (компрессорное масло), 19.6 г/г (трансформаторное масло). Сорбенты предназначены для многократного использования и по своей эффективности превосходят сорбенты на основе исходных полимерных компонентов смеси.

В [38] охарактеризованы сорбционные особенности пенополимерных сорбентов на основе смеси полиамида, полиуретана и АБС-пластика. Установлена закономерность изменения сорбционной емкости по нефти и нефтепродуктам в зависимости от соотношения компонентов смеси, объемной массы сорбентов, диаметра ячеек и пор. Показано влияние температуры окружающей среды, толщины нефтяной пленки на водной поверхности и кратности регенерации сорбента на сорбционную емкость материала.

В работе [39] приведены результаты исследований по применению отходов волокнистого полипропилена в качестве сорбента для очистки нефтесодержащих сочных вод транспортных предприятий. Показано, что оптимальное удаление нефтепродуктов и взвешенных веществ реализуется при плотности загрузки материала 75 кг/м<sup>3</sup> и скорости фильтрации 1 м/ч. При этом эффект очистки по нефтепродуктам составляет в среднем 78–79%, по взвешенным веществам – 80–81%. На основании проведенных исследований разработаны рекомендации по применению отходов волокнистого полипропилена в системах очистки нефтесодержащих сточных вод на Транспортном РУП «Локомотивное депо Лунинец» Республики Беларусь.

В статье [40] описан способ получения нефтяных порошкообразных сорбентов из отходов

полиолефинов (бывших в употреблении сельскохозяйственной и упаковочной пленки, тары, отходов кабельной промышленности и т.п.) путем охлаждения раствора полимера в алкилбензолах или n-алканах до парафинообразной массы с последующим ее измельчением в водной среде, отгонкой растворителя и сушки. Оценка эффективности использования выделенных порошков в качестве сорбентов нефти и нефтепродуктов показала, что сорбент, рассыпанный по поверхности пятна нефти, связывает ее за счет действия адгезионных сил. В результате на поверхности воды образуется твердый агломерат, который легко убирается любым механическим способом, например, с использованием ковшей из металлической сетки. Максимальная сорбционная емкость порошков, полученных из отходов полиолефинов, составляет 2.9–4.0 см<sup>3</sup>/г в зависимости от природы сорбирующей жидкости (нефть, бензин, машинное масло, дизельное топливо, гептан, толуол).

Авторами [41] исследована сорбционная способность гидрофобных волокнистых сорбентов, полученных по разработанной в ТГАСУ *Melt Blowing* технологии из отходов термопластичных полипропилена (дробленые одноразовые шприцы, пленки, катушки) и полиэтилен-терефталата (упаковки, емкости для напитков и т.д.), к ряду ионов металлов (Cu, Zn, Cr, Co, Ni, Pb, V и др.) в водных средах. В экспериментах варьировали диаметр волокон, плотность их укладки в материале, степень гидрофобности сорбента. Установлено, что оба волокнистых материала обладают примерно одинаковой сорбционной способностью, определяемой индивидуальными свойствами извлекаемых элементов. Предложен механизм сорбции ионов металлов из водных сред гидрофобными волокнистыми сорбентами.

#### **Сорбенты из синтетических полимеров**

В статье [42] рассмотрен способ получения композитного криогель-сорбента на основе поливинилового спирта и дисперсного наполнителя – железосодержащего осадка, выделенного на водозаборе Академгородка г. Томск. Для получения криогелевого материала хлопчатобумажный нетканый материал на основе целлюлозы толщиной 1.3 мм пропитывали водной суспензией поливинилового спирта с наполнителем, замораживали при –22°C в течение 20 ч, затем размораживали при 20°C в течение 4 ч. В результате получали криогелевые материалы, обладающие макропористой структурой, упругими и эластичными свойствами, хорошей термоустойчивостью (рис. 3).



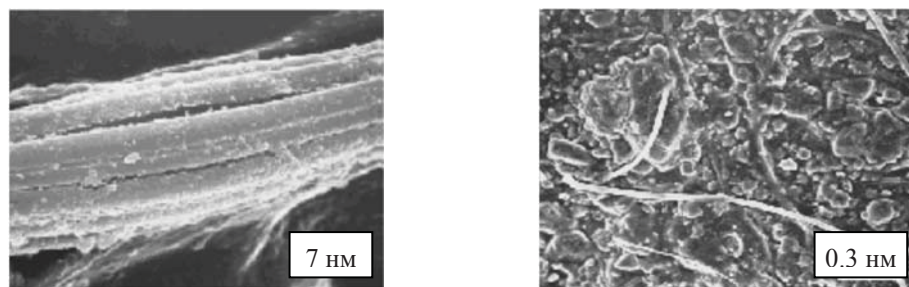


Рис. 3. СЭМ-фотографии криогель-сорбента на основе поливинилового спирта и железосодержащего модификатора [42]

Исследованы сорбционные свойства криогель-сорбента по отношению к нефти и фенолу при очистке воды. Установлено, что наиболее высокой фенол- и нефтепоглощающей способностью обладает криогель-сорбент на основе термообработанного ( $250^{\circ}\text{C}$ ) наполнителя. Степень одноступенчатой очистки воды составляет 89.5 и 93.5% по нефти и фенолу соответственно. Выявлено, что степень извлечения нефти с использованием криогель-сорбента несколько снижается по сравнению с использованием индивидуальной дисперсии железосодержащего осадка, а степень извлечения фенола значительно увеличивается. Это связано с уменьшением площади удельной поверхности и содержания пор наполнителя при формировании криогель-сорбента, а также с увеличением содержания поливинилового спирта и соответственно гидроксильных групп на поверхности материала, образующих водородные связи с молекулами фенола.

Авторами [43] получены эффективные сорбенты на основе нетканых материалов из полипропилена и полиэфира для сбора нефти и нефтепродуктов с поверхностей акваторий. Выявлено влияние структурных характеристик материалов (толщина полотна, диаметр волокон, плотность их упаковки в полотне) на их сорбционную емкость.

Оптимальные условия получения формованных композитов на основе смесей порошков нанодисперсного полиэтилена, целлюлозы, диоксида кремния и ультрадисперсных углеродных материалов описаны в [44]. Полученные пористые композиты обладают заданными сорбционными и физико-механическими характеристиками. Статическая ёмкость по керосину составляет  $1.54 \text{ см}^3/\text{г}$ . Вследствие умеренной гидрофобности не осаждаются в воде, поэтому могут использоваться для очистки поверхности водоёмов от нефти и нефтесодержащих продуктов.

В работах [45, 46] разработан способ получения сорбирующего материала для сбора нефти и нефтепродуктов с твердых, жидких и газообраз-

ных сред в виде полимерного нетканого полотна из скрепленных гидрофобных полиолефиновых (полиэтилен, полипропилен и др.) и гидрофильных (полиэфир, полиамид), либо гидрофобизированных (на основе карбоксилатных латексов) волокон с объемной плотностью  $0.01\text{--}0.06 \text{ г}/\text{см}^3$  и толщиной  $0.5\text{--}5.0 \text{ см}$ . Сорбирующий материал обладает высокой нефтеемкостью в широком диапазоне положительных и отрицательных температур при многократном его использовании. Максимальная нефтеемкость материала составляет  $53.2 \text{ г}/\text{г}$ .

Физико-химические аспекты получения стеклообразных нефтесорбентов различных форм и кажущейся плотности из пеностекла, пенополистирола и полиуретанов, а также исследование кинетики их нефтепоглощения освещены в [47–49]. Установлен специфический характер кинетических кривых нефтепоглощения, обусловленный стеклообразным состоянием поверхности материала [50, 51]. Определены перспективные области практического применения полученных результатов.

#### **Сорбенты на основе целлюлозосодержащего (полисахаридсодержащего) и другого природного полимерного сырья**

В работе [52] получен сорбент для сбора проливов углеводородных масел и эмульсий на основе коры сосны, лиственницы и пихты, экстрагированной водно-органическими смесями и гидрофобизированной полиметилсилоксановой жидкостью. Установлено, что  $1 \text{ г}$  модифицированной коры с размером частиц  $0.3\text{--}0.5 \text{ мм}$  способен удерживать до  $5 \text{ г}$  углеводородного масла и до  $8 \text{ г}$  концентрированной эмульсии типа масло–вода. Максимальная эффективность гидрофобизации и поглощения масла с водной поверхности достигается для коры лиственницы и сосны, полученной после экстракции смесями вода–метилцеллозольв и вода–метилцеллозольв–диметилформамид. Сорбционная очистка предлагаемыми сорбентами может осуществляться нанесением материала по поверхности пролива либо применением крупных



блоков или матов, содержащих сорбционный материал в качестве набивки. Насыщенные нефтепродуктами сорбенты после механического отжима могут быть использованы в качестве топлива, а без дополнительной обработки – при производстве кирпича и керамзитового гравия.

В [53] изучена возможность использования карбоксиметилированной древесины сосны, полученной суспензионным способом, в качестве сорбента нефтепродуктов и бактерий нефтедеструкторов *Rhodococcus equi*, *Micrococcus flavus*. Показано, что карбоксиметилированные производные из древесины сосны с содержанием карбоксиметильных групп 10.2–12.5% обладают нефтеемкостью 6.1–6.5 г/г, что превышает нефтеемкость исходной древесины сосны почти в 1.5 раза. Использование бактерий-нефтедеструкторов делает возможным многократное использование сорбента.

Результаты исследований магнитных сорбентов, полученных на основе модифицированных и немодифицированных древесных опилок, обладающих способностью к удалению тонких нефтяных пленок с поверхности воды, представлены в [54]. Модифицирование древесных опилок осуществляли окислительным хлорфосфорилированием с последующим гидролизом. Магнитные свойства задавали иммобилизацией наночастиц  $Fe_3O_4$  в полимерной матрице. Поглощающая емкость магнитных сорбентов составляет 2 г/г. Сорбенты обладают способностью длительно удерживать поглощенную нефть и легко извлекаются из воды магнитными ловушками.

Рецептуростроение композиционных материалов на основе вторичного полимерного сырья рассмотрено в работах [55, 56]. В качестве связующего использовали отходы пленочного производства полиолефинов, в качестве наполнителя – целлюлозосодержащие бытовые отходы («TetraPak»-упаковку, картонно-бумажную тару, древесные опилки) и пенополистирол. Проведены эксперименты по влиянию природы наполнителя и состава композита на его нефтепоглощающую способность. Показана перспективность использования данных сорбционных материалов для борьбы с разливами нефти и нефтепродуктов при авариях

В статье [57] методом обращенной газовой хроматографии определены удельные удерживаемые объемы ряда органических соединений при адсорбции на поверхности активированного углеродного гидратцеллюлозного волокна. Рассчитаны изостерические теплоты сорбции, изменения энтропии и энергии Гиббса, определены вклады в теплоту адсорбции функциональных

групп. Показана перспективность использования углеродного гидратцеллюлозного волокна для очистки воды от фенола, толуола, нефти.

В работах [58, 59] показана перспективность практического использования полимолекулярных комплексов хитозана с синтетическими (поливиниловым спиртом) и биополимерами (метилцеллюлозой, белками молочной сыворотки, желатином) в качестве сорбционных материалов для очистки воды от нефтепродуктов, фенолов, ионов металлов. Установлены закономерности поведения материалов на основе полимолекулярных комплексов при различных эксплуатационных воздействиях, что позволяет получать полимерные сорбенты, покрытия и пленки с повышенной эффективностью.

В [60] исследованы поверхностно-активные, сорбционные, солюбилизующие и диспергирующие свойства полимерных форм гуматов и сульфогуматов из выветрившихся углей Шубаркольского месторождения (Казахстан). Значения поверхностного натяжения исследуемых систем варьируются в пределах 39.1–68.5 мН/м, критические концентрации мицеллообразования –  $(0.125–6.25) \cdot 10^{-3}$  моль/л. Сорбция гуминовых сорбентов по фенолу и бензолу составляет 50–75%, нефтеемкость – 3.4–4.0 г/г. Новые формы гуминовых веществ, полученные из отходов угледобычи, представляют интерес как доступные и эффективные деструкторы нефти и нефтезагрязнений. Простая технология производства, доступность, низкая стоимость и уникальный комплекс свойств определяют перспективность их использования в качестве диспергирующих нефтесорбентов для устранения нефтяного загрязнения на воде.

Авторами [61] изучены физико-химические свойства гидрофобизованных сорбентов, полученных из гидролизных лигнинов различного происхождения. Показано, что новые сорбенты эффективны для сорбции нефти и нефтепродуктов с водной поверхности, обладают в нефтенасыщенном состоянии длительной плавучестью, легко собираются с водной поверхности в виде твердого композита с нефтепродуктом и пригодны для утилизации в виде порошкообразного или гранулированного топлива. Нефтепоглощительная способность данных сорбентов составляет 1.6–2.1 г/г (бензин), 1.7–2.4 г/г (дизельное топливо), 1.9–2.4 г/г (печное топливо), 1.9–2.5 г/г (мазут М-100).

#### **Биогибридные полимерные материалы**

В последние 10–15 лет все большую популярность приобретают гибридные полимерные сорбционные материалы с биологической составляющей, например, коммерческий сорбент



«Униполимер-Био» [7, 14]. Они перспективны не только для очистки нефтесодержащих природных, промышленных и бытовых сточных вод, но и для биоремедиации загрязненных углеводородами объектов окружающей среды. Биологическим «инструментом» биогибридных материалов являются иммобилизованные в полимерном носителе микроорганизмы [3].

Авторы [62] исследовали процесс извлечения н-додекана из водной эмульсии неткаными материалами из полипропиленового и акрилонитрильного волокон с иммобилизованными клетками нефтеокисляющих микроорганизмов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. Показана высокая эффективность процесса извлечения углеводорода (до уровня ПДК 0.05 мг/л) и возможность многократного использования биосистемы за счет саморегенерации сорбента. На примере сточной воды автомойки с суммарным содержанием нефтепродуктов 74 мг/л установлено, что достижение ПДК углеводородов возможно через 18 ч экспозиции.

В работе [63] описана технология локальной очистки сточных вод с использованием консорциума бактерий *Bacillus brevis*, *Arthrobacter species* и *Serratia* (препарат «Ленойл»), иммобилизованных на синтепоне. Степень биодеструкции углеводородов и их производных микроорганизмами биопрепарата «Ленойл», иммобилизованными на синтепоновой матрице, составляет 99.3% за трое суток экспозиции.

Авторы [64] на примере товарной нефти Альметьевского месторождения (Республика Татарстан) изучали деструкцию ее компонентов в присутствии композитных гранул агар-агара с гречишной и ячменной шелухой и микроорганизмов рода *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*,

*Arthrobacter*, *Mycobacterium* и *Bacillus*. Эксперименты проводили в двух вариантах: с консорциумами из 3 и 10 видов микроорганизмов. Показано, что развитие углеводородокисляющих бактерий в присутствии гранул сорбента с гречишной шелухой происходит значительно быстрее, чем в опытах с гранулами с ячменной шелухой. Нефтедеструкция консорциумом из 3 культур, иммобилизованных на сорбенте с гречишной шелухой, составила 66%, а консорциумом из 10 культур, иммобилизованных на том же сорбенте, – 85%.

В публикациях [3, 65, 66] описаны исследования нефтесорбционных свойств биогибридных нетканых материалов, полученных методом аэродинамического формования, из полипропилена, сополимера акрилонитрила с метилакрилатом и полиэфира с инкорпорированными биогенными элементами и иммобилизованными углеводородокисляющими бактериями *Rhodococcus qingshengii* и *Leucobacter aridicollis* (рис. 4, 5). В качестве источников биогенных элементов использовали каркасы клеточных стенок водных растений семейства Рясковые (*Lemnaceae*) и предварительно подготовленный сфагновый мох (*Sphagnum*). Показано, что клеточная культура иммобилизуется на поверхности сорбента с образованием монослоя. Коэффициент сорбционной емкости материала по мазуту достигает 70 г/г при 20°C, степень биодеградации нефти – 98% за 25 сут. Установлено также, что в присутствии биогибридного материала происходит дегградация не только алканов, но и трудно биоразлагаемых ароматических углеводородов до экологически безопасных соединений.

Авторами работы [67] фильерным способом получены волокнистые материалы на основе трех типов полимеров, содержащих алкильные, карбонильные и нитрильные функциональные

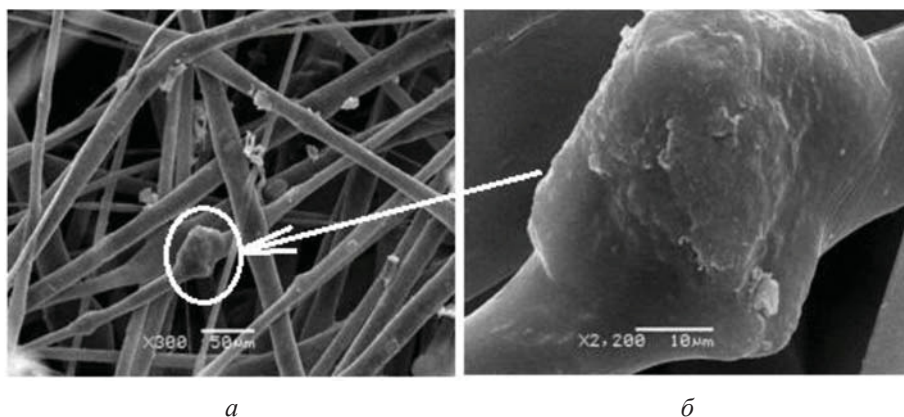
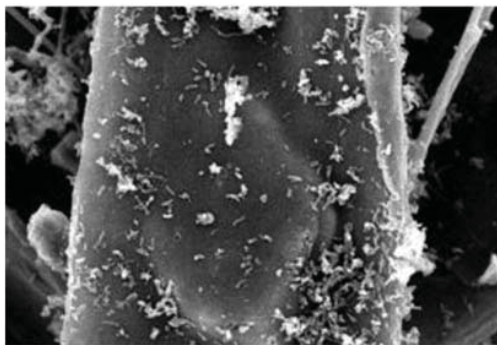
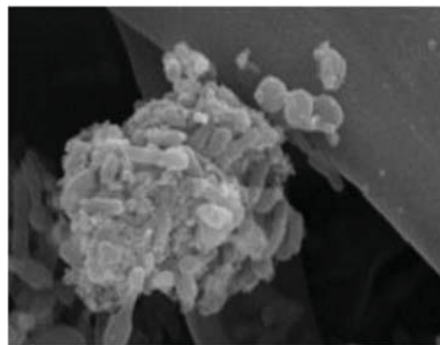


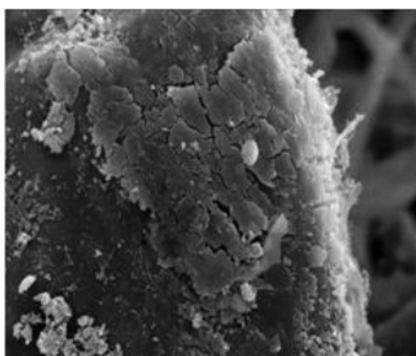
Рис. 4. Микрофотография среза образца биогибридного материала на основе сополимера акрилонитрила с метилакрилатом: а – общий вид волокон, диаметр 3–50 мкм; б – частица растения семейства Lemnaceae в полимерном волокне [3]



а



б



в

Рис. 5. Морфология бактериальных клеток на поверхности волокон биогибридного материала на основе сополимера акрилонитрила с метилакрилатом: а – монослой клеток бактериальной ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов; б – образование микроколонии растения семейства Lemnaceae; в – образование биопленки растения семейства Lemnaceae [3]

группы, различающиеся толщиной, поверхностными характеристиками волокон и плотностью их упаковки в полотне. На основе данных матриц разработаны биогибридные сорбенты путем иммобилизации нефтедеградирующих бактерий рода *Rhodococcus sp.* Проведена оценка возможности использования биогибридных материалов в качестве сорбентов для ликвидации нефтяных разливов на акваториях. Сорбционная емкость биосорбентов в отношении нефти составляет 8.1–26.5 г/г.

В работе [68] проведен анализ токсичности нетканых полимерных материалов на основе полипропилена, полиэфира, сополимера акрилонитрила-метилакрилата, используемых в качестве сорбентов для очистки акваторий от нефтезагрязнений. При этом использовали биолюминесцентную тест-систему на основе морских светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum*. Все исследованные образцы нетканых материалов не показывают выраженного ингибирующего эффекта на эмиссионную активность фотобактерий при длительной инкубации (до 48 ч). Это в соответствии с действующими критериями позволяет отнести данные нетканые полимерные сорбенты к классу

нетоксичных материалов. Установлено, что морские фотобактерии *Photobacterium phosphoreum* способны эффективно заселять поверхность волокон и межволоконное пространство нетканых матриц с образованием микроколоний и флоккул. Такие биогибридные структуры могут быть использованы для биотестирования водных сред на присутствие токсичных веществ.

Таким образом, приведенный в работе обзор русскоязычной научной, патентной и научно-технической литературы показал перспективность применения для сбора нефти и нефтепродуктов с поверхности водоемов, а также очистки углеводородзагрязненных водных сред как коммерчески доступных полимерных сорбентов, так и многих из вышеобсуждаемых лабораторных образцов. Максимальная сорбция по нефти для промышленных сорбентов «Униполимер-М» достигает 43–67 г/г; «ИРВЕЛЕН» на основе полипропилена 7.0–22.0 г/г (режим промокания) и 5.0–9.0 г/г (режим безнапорной фильтрации), на основе полиэтилентерефталата – 8.0–13.0 г/г и 3.0–9.0 г/г соответственно. Сорбент «БиоМикроГель®» переводит находящиеся в воде нефтепродукты в «желеобразное» состояние, предотвращая



их растекание и воспламенение. Максимальная сорбция для лабораторных сорбционных материалов достигает по нефти 53.2 г/г (нетканое полотно из скрепленных гидрофобных и гидрофильных волокон); по мазуту 70 г/г (биогибридные нетканые материалы из полипропилена, сополимера акрилонитрила с метилакрилатом и полиэфира); по дизельному топливу, компрессорному и трансформаторному маслу 19.6–25.2 г/г (пенополимерные сорбенты из смеси вторичного полиэтилена с акрилонитрил-бутадиен-стирольным сополимером); по бензину и мазуту 1.6–2.5 г/г (гидрофобизованные гидролизные лигнины).

### Благодарности

Работа выполнена в рамках договора (№ 17/1105-1 от 11.05.2017) между Саратовским национальным исследовательским государственным университетом имени Н. Г. Чернышевского и ООО «АКРИПОЛ» в 2017 г.

### Список литературы

1. Каменщиков Ф. А., Богомольный Е. И. Удаление нефтепродуктов с водной поверхности и грунта. М. ; Ижевск : Ин-т компьютерных исследований, 2006. 528 с.
2. Генис А. В., Байдаков Б. В., Синдеев А. А., Андрианова Л. Н., Идиатулов Р. К. Оценка сорбционных свойств полипропиленовых нетканых материалов, используемых для сбора нефтепродуктов // Нетканые материалы. Продукция, оборудование, технологии. 2012. № 3. С. 24–28.
3. Кащеева П. Б. Создание новых функциональных материалов для очистки водных сред от нефти и нефтепродуктов : дис. ... канд. хим. наук. М., 2014. 107 с.
4. Сироткина Е. Е., Новоселова Л. Ю. Материалы для адсорбционной очистки воды от нефти и нефтепродуктов // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. Т. 13, № 3. С. 359–377.
5. Веприкова Е. В., Терещенко Е. А., Чесноков Н. В., Щипко М. Л., Кузнецов Б. Н. Особенности очистки воды от нефтепродуктов с использованием нефтяных сорбентов, фильтрующих материалов и активных углей // J. of Sib. Federal Univ. Chemistry. 2010. № 3. С. 285–304.
6. Ботин Г. В., Серебренникова Ю. Г., Кайзер Ю. Ф., Мелкозеров В. М. Исследования свойств полимерных сорбентов, используемых при разливах дизельных топлив // Состояние и перспективы развития социально-культурного и технического сервиса : материалы I Всерос. науч.-практ. конф. / под ред. В. И. Беляева. Бийск : Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. С. 195–197.
7. URL: <http://sibecosorb.ru/kratko-o-sorbentah/> (дата обращения: 29.06.2018).
8. Пат. 2587440 РФ. Композиция для получения сорбента на основе карбамидоформальдегидной смолы / Мелкозеров В. М., Васильев С. И., Лапушова Л. А. ; опубл. 2016. Бюл. № 17.
9. Пат. 2593160 РФ. Полимерная композиция для пенопласта / Мелкозеров В. М., Васильев С. И., Орتمان А. С. ; опубл. 2016. Бюл. № 21.
10. Лапушова Л. А., Васильев С. И. Результаты исследования структуры полимерных сорбентов «Униполимер-М» для ликвидации техногенных разливов нефти и нефтепродуктов // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2015. № 6. С. 17–21.
11. Васильев С. И., Лапушова Л. А., Мелкозеров В. М., Матвейкина Я. В., Горбунова Л. Н. Результаты исследования гидрофильности полимерных сорбентов серии «Униполимер» // Системы. Методы. Технологии. 2016. № 1 (29). С. 135–139.
12. Мелкозеров В. М., Васильев С. И., Вельп А. Я., Крыльшкин Р. Н., Марьянчик Д. И. Эксплуатационные свойства полимерных сорбентов // J. of Sib. Federal Univ. Engineering & Technologies. 2011. № 4. С. 369–379.
13. Левченко А. Г., Витковский М. И., Куркин В. А., Федотова А. С. Рекультивация почв сельскохозяйственного назначения с применением сорбента «Униполимер-М» // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2013. № 10. С. 42–54.
14. Мелкозеров В. М., Васильев С. И., Горбунова Л. Н. Сравнительный анализ характеристик полимерных сорбентов // Машиностроение и безопасность жизнедеятельности. 2013. № 3. С. 10–14.
15. Вертячих И. М., Жукалов В. И. Полимерные волокнистые Melt Blowing материалы для ликвидации аварий с разливами нефти и нефтепродуктов // Чрезвычайные ситуации : образование и наука. 2011. Т. 6, № 1. С. 53–58.
16. Кравцов А. Г., Марченко С. А., Зотов С. В. Полимерные волокнистые фильтры для преодоления экологических последствий чрезвычайных ситуаций. Гомель : ГГТУ им. П. О. Сухого, 2008. 280 с.
17. URL: <http://inotomsk.ru/products/vysokoeffektivnyy-sorbent-na-osnove-voлокnistykh-polimernykh-materialov/> (дата обращения: 29.06.2018).
18. Отмахов В. И., Филоненко Д. А., Волокитин Г. Г., Скрипникова Н. К., Авхимович А. В. Технологическая линия по производству полимерного волокнистого сорбента для очистки водных объектов от нефти и нефтепродуктов // Экология промышленного производства. 2007. № 2. С. 74–77.
19. Волокитин Г. Г., Отмазов В. И., Кузьменко Н. И., Петрова Е. В., Гонеев В. А. Сорбенты на основе полимерных волокон и их использование на предприятиях химической, радиохимической и нефтеперерабатывающей промышленности // Энергетика, технология, экология, безопасность. 2006. № 2. С. 78–81.
20. URL: <https://irvelen.com/> (дата обращения: 29.06.2018).
21. URL: <http://biomicrogel.com/> (дата обращения: 29.06.2018).
22. Пат. 2550425 РФ. Способ сбора нефти или нефтепродуктов с поверхности воды (варианты) / Шулепов И. Д., Елагин А. А., Миронов М. А. ; опубл. 2015.



23. Elagin A. A., Mironov M. A., Shulepov I. D. Material for skimming oil or oil products from the surface water and method for its utilisation (alternative versions). WO2015190951 A1, CA2951633A1, EP3156470A1, US20170130110. URL: <https://www.google.com/patents/WO2015190951A1?cl=ru> (дата обращения: 29.06.2018).
24. Самойлов Н. А., Хлесткин Р. Н., Шеметов А. В., Шаммазов А. А. Сорбционный метод ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов. М. : Химия, 2001. 189 с.
25. Кулиев Т. Ф. Способы очистки грунта от нефтепродуктов на объектах железнодорожного транспорта. Иркутск : Изд-во ИрГУПС. 2003. 195 с.
26. Ксенофонтов М. А. Пенополиуретаны. Структура и свойства // Вестн. БГУ. Сер. 1. 2011. № 3. С. 48–52.
27. Кахраманлы Ю. Н. Пенополимерные нефтяные сорбенты. Экологические проблемы и их решения. Баку : Элм, 2012. 305 с.
28. Кахраманлы Ю. Н., Аджамов К. Ю. Исследование процесса сорбции нефти и нефтепродуктов пенополимерными сорбентами при аварийных разливах на поверхности грунта // Нефть и газ Западной Сибири : материалы Международ. науч.-техн. конф., посвящ. 55-летию Тюмен. гос. нефтегаз. ун-та. Т. 4 / отв. ред. О. Ф. Данилов. Тюмень : ТюмГНГУ, 2011. С. 321–324.
29. Кахраманлы Ю. Н. Критерии подбора пенополимерных сорбентов в процессе локализации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов на водной поверхности // Вода : Химия и экология. 2012. № 5. С. 70–75.
30. Кахраманлы Ю. Н. Классификация пенополимерных нефтяных сорбентов // Вода : Химия и экология. 2012. № 7. С. 39–43.
31. Чикина Н. С., Мухамедшин А. В., Зенитова Л. А. Сорбент на основе пенополиуретана и шелухи гречихи для сбора нефтяных разливов // Успехи в химии и химической технологии. 2007. Т. 21, № 5 (73). С. 38–42.
32. Веприкова Е. В., Терещенко Е. А., Чесноков Н. В., Кузнецов Б. Н. Волокнистые древесно-полистирольные сорбенты для ликвидации нефтяных загрязнений // J. of Sib. Federal Univ. Chemistry. 2011. № 4. P. 27–37.
33. Чикина Н. С., Мухамедшин А. В., Анкудинова А. В., Зенитова Л. А., Сироткин А. С., Гарабаджиу А. В. Снижение экологической нагрузки от разливов нефти и нефтепродуктов с помощью сорбента на основе пенополиуретана и отходов зерновых культур // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2009. № 6. С. 184–192.
34. Магеррамов А. М., Азизов А. А., Алоسمанов Р. М., Керимова Э. С., Буниятзаде И. А. Использование полимеров в качестве сорбентов // Молодой учёный. 2015. Т. 8 4, № 4. С. 38–41.
35. Магеррамов А. М., Азизов А. А., Алоسمанов Р. М., Буниятзаде И. А. Исследование продуктов окислительного хлорфосфорилирования альфа-олефинов (гексена, октена, децена) в качестве реагентов для удаления тонкой пленочной нефти // Изв. вузов. Прикл. химия и биотехнология. 2012. Т. 2, № 1. С. 165–170.
36. Бухарова Е. А., Татаринцева Е. А., Ольшанская Л. Н. Исследование сорбционных свойств материала на основе полиэтилентерефталата для очистки сточных вод от нефтепродуктов и ионов тяжелых металлов // XXI век : итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. Пенза : Изд-во Пенз. гос. технол. ун-та, 2014. № 1 (17). С. 118–122.
37. Кахраманлы Ю. Н. Особенности сорбции нефтепродуктов пенополимерными сорбентами на основе смеси полиэтилена и акрилонитрил-бутадиен-стирольного пластика // Вода : Химия и экология. 2012. № 1. С. 65–70.
38. Кахраманов Н. Т., Гаджиева Р. Ш. Сорбционные особенности пенополимерных сорбентов на основе смеси полиамида, полиуретана и АБС-сополимера // Транспорт и хранение нефтепродуктов. 2014. № 1. С. 47–53.
39. Грузинова В. Л. Вторичное использование отходов химической промышленности в системах очистки нефтесодержащих сточных вод // Вестн. Полоцк. гос. ун-та. Сер. Ф. Прикладные науки. Строительство. 2007. № 12. С. 151–155.
40. Почивалов К. В., Бурмистрова М. Ю., Владимиров А. В., Голованов Р. Ю., Юров М. Ю., Сиганов Д. Л. Получение и использование сорбентов нефти и нефтепродуктов из отходов полиолефинов // Экология и промышленность России. 2005. № 10. С. 1–12.
41. Петрова Е. В., Асташкина А. П., Филоненко Д. А., Отмахов В. И., Изаак Т. И., Волокитин Г. Г. Исследование перспектив использования гидрофобных волокнистых сорбентов для очистки вод от ионов металлов // Изв. ТПУ. 2007. Т. 310, № 2. С. 136–140.
42. Сироткина Е. Е., Погадаева Н. И., Фуфаева М. С. Криогель-сорбент на основе поливинилового спирта и железосодержащего осадка для удаления нефти и фенола из воды // Изв. Том. политехн. ун-та. 2010. Т. 317, № 3. С. 49–53.
43. Дедов А. Г., Белоусова Е. Е., Кащеева П. Б., Беляева Е. И., Омарова Е. О., Лобакова Е. С., Иванова Е. А., Идиатулов Р. К., Генис А. В., Бузник В. М. Эффективные сорбирующие полимерные материалы для сбора нефти и нефтепродуктов // Хим. технология. 2013. Т. 10, № 14. С. 606–617.
44. Базунова М. В., Идрисов И. Ф., Базунов А. А., Ахметханов Р. М. Сорбционно-активные гибридные полимерные наноккомпозиты на основе полиэтилена и неорганических компонентов // Науч. альманах. 2017. № 2–3 (28). С. 422–426.
45. Пат. 2461421 РФ. Сорбирующий материал для сбора нефти и нефтепродуктов и способ его получения / Щипакина Е. Ф. ; опубл. 2012.
46. Пат. 2166362 РФ. Сорбирующий материал для сбора нефти и нефтепродуктов, способ его получения / Лакина Т. А., Дегтярев В. А. ; опубл. 2001.
47. Коган В. Е., Згонник П. В., Шахпаронова Т. С., Ковина Д. О. Физико-химические аспекты получения нефтесорбентов из фосфатных пеностекол и кинетика нефтепоглощения // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2014. № 4-1. С. 33–36.



48. Коган В. Е., Згонник П. В., Шахпаронова Т. С., Черняев В. А. Кинетика нефтепоглощения стеклообразными сорбентами органической природы // *Международ. науч.-исслед. журн.* 2016. № 5 (47), ч. 5. С. 104–107.
49. Коган В. Е., Згонник П. В., Ковина Д. О., Черняев В. А. Использование пеностекла и полимерных материалов в качестве эффективных нефтесорбентов // *Стекло и керамика.* 2013. № 12. С. 3–7.
50. Коган В. Е. Стеклообразные пеноматериалы неорганической и органической природы и перспективы очистки окружающей среды от загрязнений нефтью и нефтепродуктами // *Записки Горного института.* 2016. Т. 218. С. 331–338.
51. Коган В. Е., Згонник П. В., Шахпаронова Т. С., Суворова З. В. Характер кинетических кривых нефтепоглощения стеклообразными сорбентами органической природы как функция структурных особенностей используемого полимера // *Международ. науч.-исслед. журн.* 2017. № 6-2 (60). С. 88–93.
52. Семенович А. В., Лоскутов С. Р., Пермякова Г. В. Сбор проливов нефтепродуктов модифицированной корой хвойных пород // *Химия растительного сырья.* 2008. № 2. С. 113–117.
53. Маркин В. И., Курланова С. В., Ильичева Т. Н., Базарнова Н. Г., Колосов П. В. Биоразлагаемые сорбенты нефти // *Биотехнология и общество в XXI веке* : сб. ст. Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2015. С. 207–209.
54. Бунятзаде И. А., Мамедов Г. Г., Азизов А. А., Аломанов Р. М., Магеррамов А. М. Магнитный сорбент для удаления тонких нефтяных пленок // *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2010. Т. 53, № 4. С. 114–117.
55. Скопинцев И. В., Мелешкина А. М., Мясоедова В. В. Термохимическая конверсия и композиционные сорбенты для нефтепродуктов на основе смесей целлюлозосодержащих и полимерных отходов упаковки // *Изв. МГТУ «МАМИ».* 2013. Т. 2, № 3 (17). С. 86–90.
56. Скопинцев И. В., Мелешкина А. М., Камшиад Ф. Новое применение вторичных полимерных композиционных материалов // *Изв. МГТУ.* 2012. № 2. С. 197–201.
57. Валинурова Э. Р., Кадырова А. Д., Кудашева Ф. Х. Адсорбционные свойства углеродного гидратцеллюлозного волокна // *Вестн. Башкир. ун-та.* 2008. Т. 13, № 4. С. 907–910.
58. Каблов В. Ф., Иощенко Ю. П. Проблема сбора нефти и нефтепродуктов при аварийных разливах // *Фундаментальные исследования.* 2004. № 6. С. 64–65.
59. Каблов В. Ф., Иощенко Ю. П., Жидков А. Ю. Разработка способов ликвидации аварийных разливов нефти на поверхности воды и грунта // *Наука производству.* 2005. № 1 (81). С. 13–17.
60. Аккулова З. Г., Амирханова А. К., Жакина А. Х., Василец Е. П., Арнт О. В., Кудайберген Г. К. Физико-химические свойства гуминовых нефтесорбентов // *Изв. науч.-техн. о-ва «КАХАХ».* 2017. № 1 (56). С. 19–27.
61. Гриншпан Д. Д., Тельшева Г. М., Неавар Т. Н., Дижбит Т. Н., Цыганкова Н. Г., Аршаница А. С., Головкин А. С., Солодовник В. П. Нефтесорбент на основе гидролизного лигнина // *Вестн. НАН Беларуси. Сер. хим. наук.* 2011. № 2. С. 23–28.
62. Лейкин Ю. А., Черкасова Т. А., Смагина Н. А. Саморегенерирующиеся сорбенты для очистки воды от нефтяных углеводородов // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2008. Т. 8, вып. 4. С. 586–599.
63. Кобышева Н. В., Гатауллин А. Г., Силищев Н. Н., Логинов О. Н. Разработка технологии очистки сточной воды с использованием иммобилизованной микрофлоры // *Вестн. ОГУ.* 2009. № 1. С. 104–107.
64. Морозов Н. В., Хуснетдинова Л. З., Жукова О. В. Использование иммобилизованных на органическом сорбенте нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // *Фундаментальные исследования.* 2011. № 12. С. 576–579.
65. Пат. 2528863 РФ. Биоразлагаемый композиционный сорбент нефти и нефтепродуктов / Дедов А. Г., Иванова Е. А., Белоусова Е. Е., Кашеева П. Б., Карпова Е. Ю., Идиатулов Р. К., Кирпичников М. П., Лобакова Е. С., Васильева С. Г., Соловченко А. Е. ; опубл. 2014. Бюл. № 26.
66. Пат. 2469787 РФ. Сорбирующий композиционный материал / Дедов А. Г., Мясоедов Б. Ф., Бузник В. М., Омарова Е. О., Беляева Е. И., Некрасова В. В., Идиатулов Р. К., Генис А. В., Синдеев А. А., Перевертайло Н. Г., Кашеева П. Б., Тузинович А. М. ; опубл. 2012. Бюл. № 35.
67. Омарова Е. О., Лобакова Е. С., Дольникова Г. А., Некрасова В. В., Идиатулов Р. К., Кашеева П. Б., Перевертайло Н. Г., Дедов А. Г. Иммобилизация бактерий на полимерных матрицах для деградации нефти и нефтепродуктов // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* 2012. № 1. С. 28–35.
68. Лобакова Е. С., Исмаилов А. Д., Кашеева П. Б., Алескерова Л. Э., Омарова Е. О., Идиатулов Р. К., Иванова Е. А., Белоусова Е. Е., Дедов А. Г. Определение токсичности нефтесорбентов на основе нетканых полимерных материалов биолюминисцентным методом // *Хим. технология.* 2013. Т. 14, № 11. С. 672–678.

**Polymeric Sorbents for the Collection of Oil and Oil Products from the Surface of Reservoirs: a 2000–2017 Review of the Russian-language Literature (Part 3)**

**T. A. Bayburdov, A. V. Shipovskaya**

Telman A. Bayburdov, ORCID 0000-0003-1734-5323, ACRYPOL Ltd., 1, Sovetsko-Chekhoslovatskoy Druzhby Sq., Saratov, 410059, Russia; Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, bta@acrypol.ru

Anna V. Shipovskaya, ORCID 0000-0003-1916-4067, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, shipovskayaab@yandex.ru

The Russian 2000–2017 scientific, technical and patent literature devoted to the problems of the development and practical applications of polymeric sorbents for the collection of spilled oil and oil products from the surface of reservoirs and for the purification of hydrocarbon-containing aquatic environments was searched and



analyzed. Several polymeric oil sorbents produced on the basis of foamed urea-formaldehyde resins (Unipolymer-M™, Unipolymer-Bio™), polypropylene and polyethylene terephthalate by the melt blowing technology (IRVELEN™) and polysaccharide microgels (BiomicroGel®), commercially available in the Russian Federation, are considered. The maximum oil sorption for Unipolymer-M™ reaches 43–67 g/g; that for polypropylene-based IRVELEN™ reaches 7.0–22.0 g/g (a wetting mode) and 5.0–9.0 g/g (a non-pressure filtration mode), and IRVELEN™ based on polyethylene terephthalate shows 8.0–13.0 g/g and 3.0–9.0 g/g for both modes, respectively. The sorbent BiomicroGel™ transfers water in oil products into a gel-like state, preventing their spreading and ignition. Researches in the field of the most promising polymeric materials with high sorption ability to hydrocarbons are analyzed. Several major classes of modern polymeric sorption materials are resolved, namely: foamed polymeric sorbents, materials based on the processing of secondary polymeric raw materials, sorbents made of synthetic polymers, sorbents based on cellulose-containing (polysaccharide-containing) and other natural polymeric raw ma-

terials, and biohybrid polymeric materials. Characteristics of the proposed oil sorbents are given. The maximum sorption for these materials is: 53.2 g/g for oil (nonwovens of bonded hydrophobic and hydrophilic fibers), 70 g/g for fuel oil (biohybrid nonwovens of polypropylene, the copolymer of acrylonitrile with methyl acrylate, and polyester), 19.6–25.2 g/g for diesel fuel, compressor and transformer oil (foamed polymeric sorbents made of a mixture of secondary polyethylene with acrylonitrile–butadiene–styrene copolymer), and 1.6–2.5 g/g for gasoline and fuel oil (hydrophobized hydrolyzed lignins). The prospects of using the sorbents of these classes for cleaning the surfaces of reservoirs from oil spills and oil products are estimated.

**Key words:** polymer, sorbent, oil, hydrocarbons.

*Acknowledgements:* This work was carried out in the framework of Contract (no. 17/1105-1 from 11.05.2017) between Saratov State University and ACRYPOL Ltd. in 2017.

---

**Образец для цитирования:**

Байбурдов Т. А., Шиповская А. Б. Полимерные сорбенты для сбора нефтепродуктов с поверхности водоёмов: обзор русскоязычной литературы за 2000–2017 гг. (часть 3) // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 285–298. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-285-298

**Cite this article as:**

Bayburdov T. A., Shipovskaya A. B. Polymeric Sorbents for the Collection of Oil and Oil Products from the Surface of Reservoirs: a 2000–2017 Review of the Russian-language Literature (Part 3). *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 285–298 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-285-298

---





УДК 544:[544.72.023.221+544.72.023.26]

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СООТНОШЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ В СМЕШАННЫХ МОНОСЛОЯХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК И АРАХИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА МОРФОЛОГИЮ ПЛЕНОК, ПОЛУЧЕННЫХ НА ИХ ОСНОВЕ



И. А. Горбачев, Е. Г. Глуховской

Горбачев Илья Андреевич, инженер отдела наномеханики Образовательно-научного института наноструктур и биосистем, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [iliyagor36@gmail.com](mailto:iliyagor36@gmail.com)

Глуховской Евгений Геннадьевич, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией пленочных и наноструктурированных материалов Образовательно-научного института наноструктур и биосистем, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [glukhovskoy@gmail.com](mailto:glukhovskoy@gmail.com)

В работе изучен процесс формирования смешанных монослоев растворов гидрофобных квантовых точек, стабилизированных триоктилфосфин оксидом, и молекул арахидоновой кислоты. Выявлена зависимость вида изотерм сжатия смешанного монослоя квантовые точки – арахидоновая кислота от мольного соотношения компонентов. Описано влияние мольного соотношения компонентов смеси арахидоновая кислота – квантовые точки на свойства смешанных ленгмюровских монослоев на поверхности воды и пленок, сформированных на их основе, на твердых подложках. В частности, было продемонстрировано его влияние на морфологию пленок и на их физические параметры, такие как шероховатость. Установлено, что для изменения расстояния между квантовыми точками диаметром 8 нм в плотноупакованном монослое необходимо как минимум 26 молекул арахидоновой кислоты, приходящихся на одну квантовую точку.

**Ключевые слова:** квантовые точки, смешанные монослои квантовых точек, ленгмюровские пленки.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-299-305

### Введение

В настоящее время квантовые точки (КТ) являются перспективным материалом, широко используемым в различных областях науки и техники [1, 2]. Так, наряду с применением в качестве флуоресцентных маркеров в иммуноанализе [3, 4] в последние годы наблюдается увеличение количества работ, связанных с использованием КТ в качестве компонентов светоизлучающих и светопреобразующих приборов [5, 6]. В контексте создания светоизлучающих устройств и их компонентов все чаще можно встретить словосочетание «монослой квантовых точек» [7, 8]. Технология Ленгмюра–Блоджетт является одним из способов, позволяющих сформировать на водной субфазе монослой КТ, а также перене-

сти его на твердую подложку. При этом плюсом технологии в сравнении, например, с методом нанесения покрытий центрифугированием или послойной сборкой является возможность управления расстоянием между КТ с сохранением высокой степени упорядоченности пленки. При решении данной задачи достаточное внимание уделено изучению влияния типа и геометрии молекул стабилизатора на свойства монослоев КТ [7, 9, 10]. В частности, авторами были продемонстрированы особенности формирования монослоев КТ при использовании стабилизаторов с различной длиной цепи углеводородного радикала [9]. В работе [11] исследованы процессы самоорганизации на поверхности водной субфазы КТ, стабилизированных полимерными молекулами, что позволило сформировать нанопровода, геометрия которых зависит от концентрации внесенного на поверхность раствора и соотношения объема КТ с определенным типом стабилизатора в рабочем растворе. Были проведены исследования влияния температуры водной субфазы на процесс формирования монослоев КТ и на их стабильность [12]. Установлено, что в случае изменения температуры водной субфазы происходит изменение типа жидкого состояния монослоя КТ, стабилизированных олеиновой кислотой, с жидкоконденсированного, при температурах, меньших 25 °С на жидкорасширенному, при больших значениях температуры. Также авторами было продемонстрировано изменение коэффициента диффузии вещества монослоя с поверхности в объем водной субфазы и толщины статического слоя при изменении температуры субфазы [13].

Особую актуальность расстояние между КТ начинает играть при разработке химических и биосенсоров на основе КТ. В частности, описанная идея имеет перспективу дальнейшего использования при создании сенсоров и платформ с использованием эффекта флуоресцентного резонансного переноса энергии [14, 15]. В этом случае одним из возможных вариантов решения указанной задачи является формирование смешанных монослоев КТ и молекул органической



матрицы, отделяющих их друг от друга. При кажущейся простоте идеи решение подобной задачи нетривиально и практически не представлено в литературе. Поэтому целью данной работы было изучение особенностей формирования смешанных монослоев КТ и молекул ПАВ в зависимости от их мольного соотношения в растворе.

### Материалы и методы

Использовали раствор квантовых точек CdSe/CdS/ZnS, стабилизированных триоктилфосфин оксидом (ТОПО), диаметром 8 нм в хлороформе с концентрацией КТ 1 мг/мл [16]. Раствор арахидиновой кислоты с концентрацией

0.1 мг/мл был приготовлен из сухой арахидиновой кислоты 99% Sigma Aldrich, которую растворяли в хлороформе 99.5% Sigma Aldrich. Смешиванием исходных растворов КТ и арахидиновой кислоты (АРАХ) были получены рабочие растворы КТ:АРАХ с мольными соотношениями 1:5, 1:13, 1:26, 1:52 и 1:130. Аликвоту раствора объемом 150 мкл закапывали на поверхность деионизованной воды с удельным сопротивлением 18 МОм×см и сжимали подвижными барьерами с постоянной скоростью убыли площади, равной 5 см<sup>2</sup>/мин. На рис. 1, а представлено изображение плотноупакованного лэнгмюровского монослоя КТ, стабилизированных ТОПО.

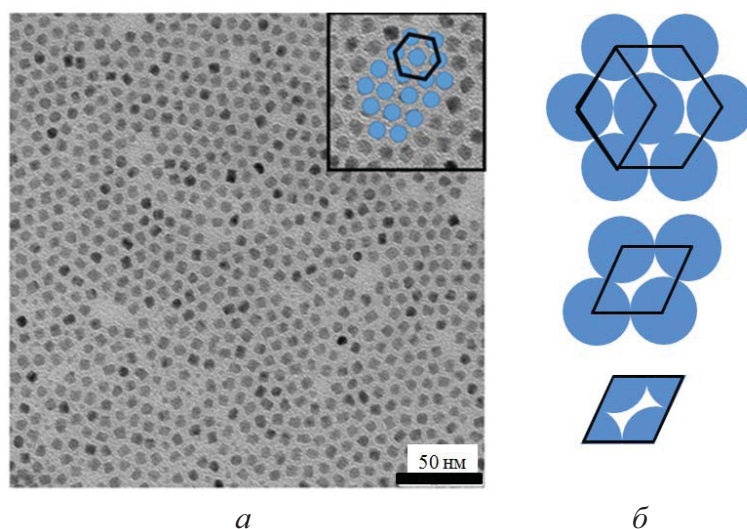


Рис. 1. Изображение просвечивающей электронной микроскопии плотноупакованного монослоя квантовых точек (а) и построения, поясняющие расчеты упаковки КТ (б)

При анализе изображения просвечивающей электронной микроскопии плотноупакованных лэнгмюровских монослоев КТ заметно, что КТ находятся в вершинах шестиугольника, формируя гексагональную упаковку (см. рис. 1, а). Таким образом, для того чтобы изменить расстояние между КТ, необходимо заполнить пустые области, расположенные между молекулами ПАВ. Зная диаметр КТ, возможным становится оценить площадь, которую необходимо заполнить молекулами ПАВ. Так, для КТ радиусом  $r$  число молекул ПАВ, при котором расстояние между КТ в плотноупакованной пленке изменяться не будет, можно оценить из соотношения

$$A_0 n = 0.34r^2, \quad (1)$$

где  $A_0$  – площадь молекулы ПАВ, занимаемая в плотноупакованном монослое,  $n$  – число молекул ПАВ, приходящееся на одну КТ,  $r$  – радиус КТ.

Для расчетов упаковки КТ можно взять элементарную ячейку в виде ромба со стороной, равной диаметру КТ, в который будут включены четыре части КТ, как показано на рис. 1, б. Тогда площадь одной элементарной ячейки для плотноупакованных КТ будет составлять 55.4 нм. В этом случае на одну КТ будет приходиться не больше чем 26 молекул ПАВ. В работе [17] был проведен анализ фазовых состояний смешанного монослоя КТ : АРАХ при мольном соотношении компонентов раствора 1:26, на основании чего был сделан пересчет площади монослоя в площадь на элементарную ячейку.

Из физического смысла и методики расчета шероховатость  $R_a$  рассчитывается по формуле

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |y_i|, \quad (2)$$

где  $y_i$  – абсолютное отклонение от средней линии профиля ( $T$ , рис. 2).

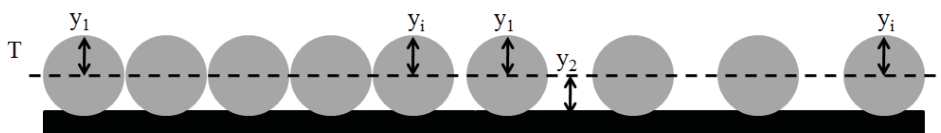


Рис. 2. Изменение шероховатости при изменении расстояния между КТ в пленке

### Результаты и их обсуждение

Изотермы сжатия монослоев приведены на рис. 3.

В таблице приведены значения параметров монослоев смесей квантовых точек и арахидиновой кислоты, рассчитанных по изотермам сжатия: значения углов наклона касательных, проведенных к участку изотермы сжатия с максимальным углом наклона ( $K$ ), коэффици-

ентов сжимаемости ( $\delta$ ), модулей сжатия ( $\chi$ ) и значений давления переноса ( $TP$ ). На графике зависимости модуля сжатия от мольного соотношения компонентов смеси КТ:АРАХ заметно, что при соотношении 1:26 модуль сжатия достигает минимального значения. При этом при уменьшении количества арахидиновой кислоты в растворе смеси, так же как и при ее увеличении, происходит увеличение значения модуля сжатия.

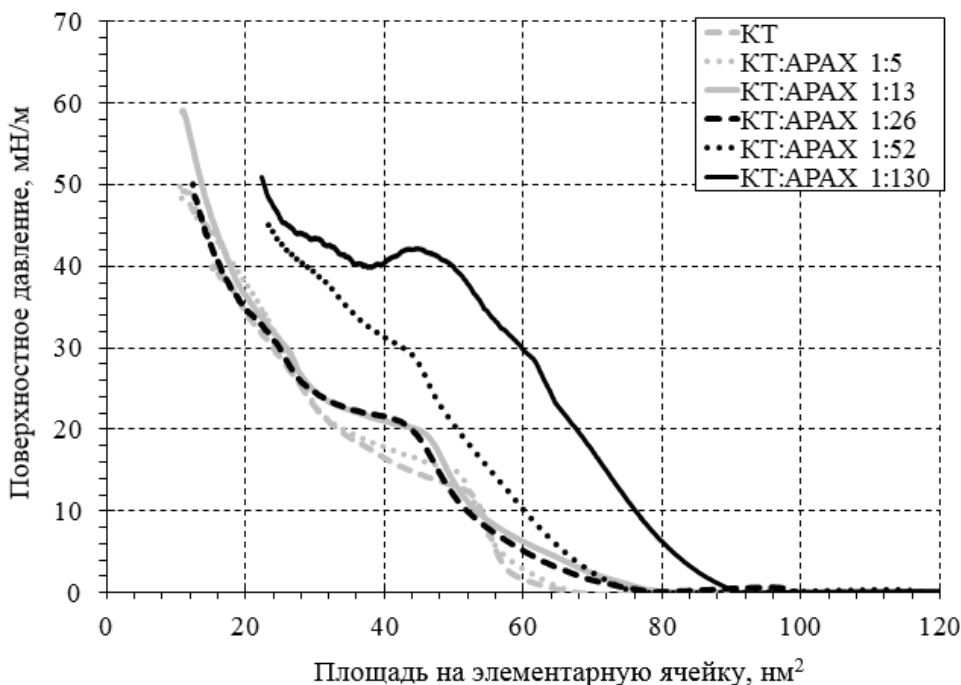


Рис. 3. Зависимость изотерм сжатия от мольного соотношения компонентов смешанного монослоя

#### Зависимость свойств смешанных монослоев КТ:АРАХ от мольного соотношения компонентов

КТ:АРАХ	$TP$ , мН/м	$K$	$\delta$ , м/мН	$\chi$ , мН/м
$\infty$	44	14.8	0.001	777
1:130	26	1.24	0.007	136
1:52	26	0.87	0.009	105
1:26	16	0.61	0.012	83.6
1:13	15	0.63	0.011	95.6
1:5	13	0.74	0.009	118
1:0	9	0.74	0.008	130

Монослои были перенесены на твердые стеклянные подложки при поверхностных давлениях, приведенных в таблице, и исследованы методом атомно-силовой микроскопии на установке NT-MDT Ntegra Spectra. Изображения АСМ, полученные в ходе исследования смешанных монослоев, приведены на рис. 4.

При увеличении числа молекул ПАВ, приходящихся на одну квантовую точку, происходит изменение морфологии сформированной пленки, а именно увеличение расстояния между КТ, вследствие чего в пленке появляются

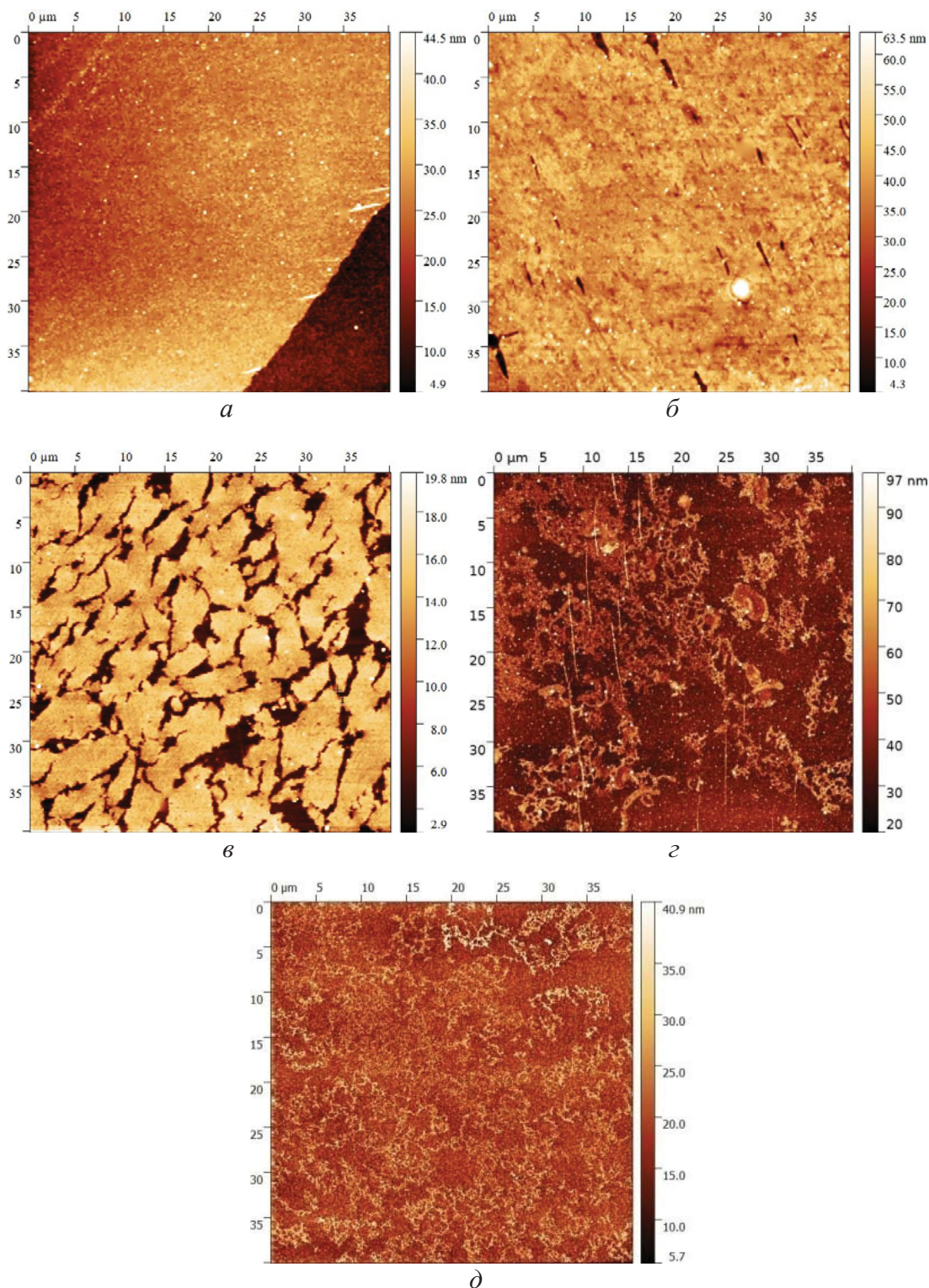


Рис. 4. Зависимость морфологии пленок, полученных на основе смешанных монослоев КТ : АРАХ, от мольного соотношения компонентов: а – 1:5, б – 1:13, в – 1:26, г – 1:52, д – 1 : 130

области с высотой, отличающейся от средней высоты пленки. Об этом можно сделать вывод, обратившись к сечению профиля поверхности пленки при соотношении КТ : АРАХ 1 : 26

(рис. 5). Заметно, что перепады, обозначенные 1 и 2 на рис. 5, высот в этом случае составляют порядка 8 нм, что сопоставимо с диаметром квантовой точки.

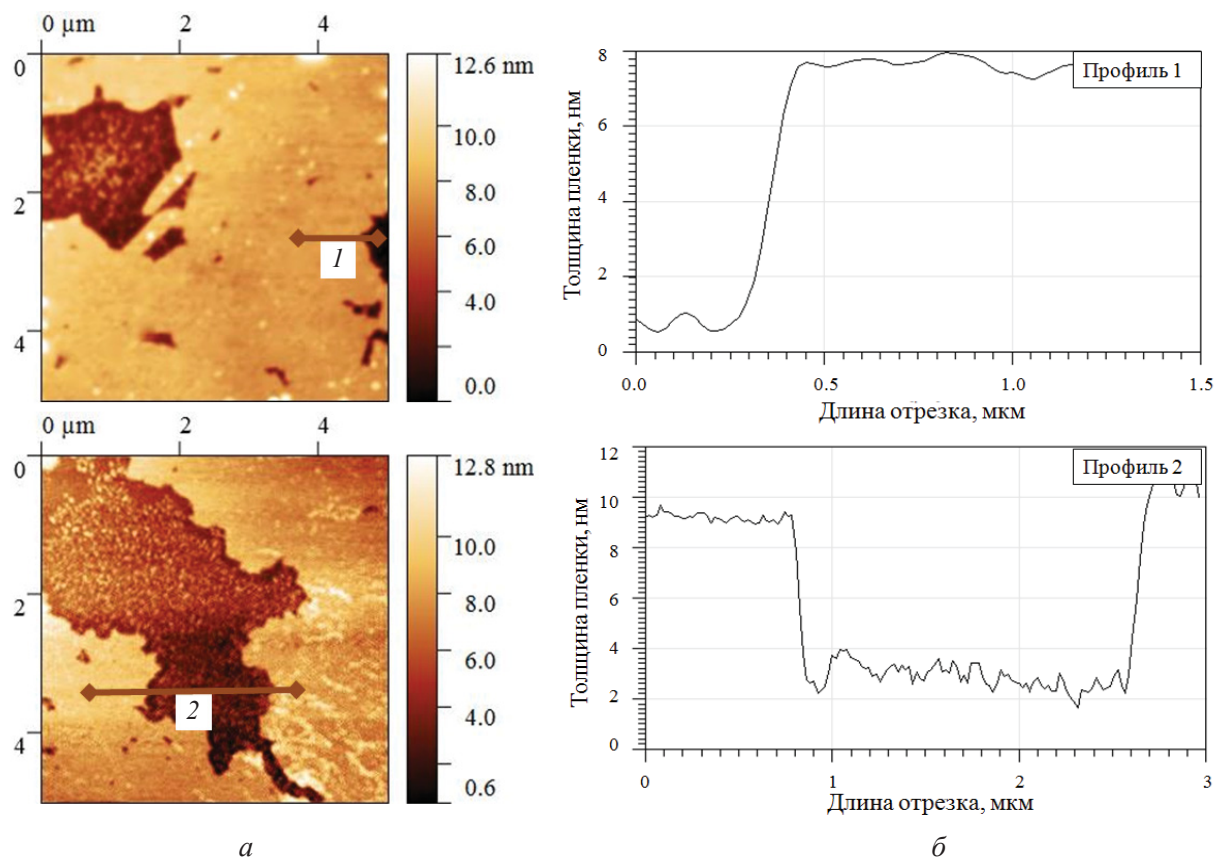


Рис. 5. АСМ изображение поверхности пленки КТ : АРАХ 1:26 (а) и профили ее поверхности (б)

Похожий вывод об изменении расстояния между КТ в процессе увеличения числа молекул арахидиновой кислоты в смешанном монослое можно сделать, основываясь на изменении шероховатости поверхности пленок (рис. 6), изученной для участков площадью  $2 \times 2$  мкм.

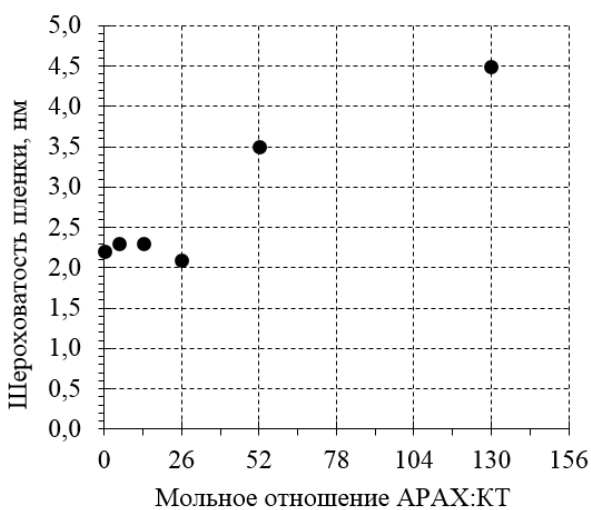


Рис. 6. Зависимость шероховатости пленки смешанного монослоя квантовых точек и арахидиновой кислоты от молярного соотношения компонентов

Видно, что при увеличении концентрации арахидиновой кислоты в смешанном монослое КТ:АРАХ изменение шероховатости формируемой пленки начинается при увеличении доли арахидиновой кислоты больше, чем 1:26, а именно при молярных соотношениях 1:5, 1:13 и 1:26 шероховатость пленки не превышает 2.4 нм, для соотношений 1:52 и 1:130 значение шероховатости увеличивается до 3.5 и 4.5 нм соответственно.

Из формулы (2) и методики расчета шероховатости следует, что  $R_a$  может иметь минимальные значения для двух крайних случаев: для монослоя без КТ и для плотноупакованного слоя КТ с минимальными просветами между ними. В нашем случае значения  $R_a$  изменяются от малых к большим примерно в два раза величинам, что свидетельствует о появлении в плотной упаковке КТ просветов с другим уровнем высот, соответствующих толщине монослоя.

Таким образом, на основании исследований для смешанных ленгмюровских монослоев КТ:АРАХ на поверхности воды и пленок ЛБ, полученных на их основе на поверхности твердых подложек, предложено аналитическое выражение, согласно которому можно вычислить



минимальную долю молекул матрицы ПАВ, при увеличении которой расстояние между КТ в ленточном слое увеличивается, что приводит к росту величины шероховатости пленки. Предложенное выражение позволило рассчитать мольное соотношение КТ:АРАХ для случая КТ диаметром 8 нм, равное 1:26.

### Список литературы

1. *Randall J. N., Luscombe J. H.* Chapter 13 - Quantum Dot Devices // *VLSI Electronics Microstructure Science*. 1994. Vol. 24. P. 419–445.
2. *Kima H. S., Yoon K. B.* Preparation and characterization of CdS and PbS quantum dots in zeolite Y and their applications for nonlinear optical materials and solar cell // *Coordination Chem. Rev.* 2014. Vol. 263–264. P. 239–256.
3. *Kale S., Kale A., Gholap H., Rana A., Desai R., Banpurkar A., Ogale S., Shastry P.* Quantum dot bio-conjugate: as a western blot probe for highly sensitive detection of cellular proteins // *J. Nanopart. Res.* 2012. Vol. 14. P. 732–747.
4. *Олейников В. А., Суханова А. В., Набиев И. П.* Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине // *Рос. Нанотехнологии*. 2007. Т. 2, № 1–2. С. 160–173.
5. *Martin-Sanchez J., Munoz-Matutano G., Herranz J., Canet-Ferrer J., Alen B., Gonzalez Y., Alonso-Gonzalez P., Fuster D., Gonzalez L., Martinez-Pastor J., Briones F.* Single Photon Emission from Site Controlled In As Quantum Dots Grown on GaAs(001) Patterned Substrates // *ACS Nano*. 2009. Vol. 3, № 6. P. 1513–1517.
6. *Kalliakos S., Pellegrini V., Garcia C. P.* Optical Control of Energy-Level Structure of Few Electrons in AlGaAs/ GaAs Quantum Dots // *Nano Lett.* 2008. Vol. 8, № 2. P. 577–581.
7. *Justo Y., Moreels I., Lambert K., Hens Z.* Langmuir-Blodgett monolayers of colloidal lead chalcogenide quantum dots : morphology and photoluminescence // *Nanotechnology*. 2010. Vol. 21. P. 295606–295612.
8. *Lotito V., Zambelli T.* Self-Assembly of Single-Sized and Binary Colloidal Particles at Air/Water Interface by Surface Confinement and Water Discharge // *Langmuir*. 2016. Vol. 32. P. 9582–9590.
9. *Lambert K., Wittebrood L., Moreels I., Deresmes D., Grandier B., Hens Z.* Langmuir-Blodgett monolayers of InP quantum dots with short chain ligands // *J. of Colloid and Interface Sci.* 2006. Vol. 300, № 2. P. 597–602.
10. *Xu J., Ji X., Gattas-Asfura K. M., Wang C., Leblanc R. M.* Langmuir and Langmuir-Blodgett films of quantum dots // *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects*. 2006. Vol. 284–285. P. 35–42.
11. *Cheyne R. B., Moffitt M. G.* Controllable Organization of Quantum Dots into Mesoscale Wires and Cables via Interfacial Block Copolymer Self-Assembly // *Macromolecules*. 2007. Vol. 40. P. 2046–2057.
12. *Gorbachev I. A., Goryacheva I. Y., Brezesinski G., Gluhovskoy E. G.* The study of the formation of monolayers of quantum dots at different temperatures // *Proc. SPIE 9917. Saratov Fall Meeting 2015 : Third Intern. Symp. on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symp. (PALS) 99171J.* Saratov, 2016. DOI: 10.1117/12.2228455
13. *Gorbachev I. A., Shtykov S. N., Brezesinski G., Gluhovskoy E. G.* Studying of Quantum Dots Langmuir Monolayers Stability at the Different Subphase Temperature // *BioNanoScience*. 2017. Vol. 7, № 4. P. 686–691. DOI: 10.1007/s12668-017-0404-4
14. *Gole A., Jana N. R., Selvan S. T., Ying J. Y.* Langmuir-Blodgett Thin Films of Quantum Dots: Synthesis, Surface Modification, and Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Studies // *Langmuir*. 2008. Vol. 24. P. 8181–8186.
15. *Constantino C. J. L., Lemma T., Antunes P. A., Aroca R.* Single-Molecule Detection Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering and Langmuir-Blodgett Monolayers // *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 3674–3678.
16. *Speranskaya E. S., Beloglazova N. V., Lenain P., De Saeger S., Wang Z., Zhang S., Hens Z., Knopp D., Potapkin D. V., Goryacheva I. Y.* Polymer-coated fluorescent CdSe-based quantum dots for application in immunoassay // *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. Vol. 53. P. 225–231.
17. *Gorbachev I. A., Gluhovskoy E. G.* The depending of Langmuir monolayers of quantum dots and fatty acid mixture properties from their components ratio // *Proc. SPIE 10336, Saratov Fall Meeting 2016 : Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII*, 1033603. Saratov, 2017. DOI: 10.1117/12.2269372

### The Studying of Components Ratio Influence in Mixed Monolayers of Quantum Dots and Arachidic Acid on the Films Morphology Based on Them

I. A. Gorbachev, E. G. Gluhovskoy

Ilya A. Gorbachev, ORCID: 0000-0002-5682-0492, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, iilyagor36@gmail.com

Evgeny G. Gluhovskoy, ORCID: 0000-0002-8282-3638, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, gluhovskoy@gmail.com

The formation process of quantum dots stabilized by the trioctylphosphine oxide and arachidic acid molecules mixed monolayers was studied. An equation that determines a dependence of numbers of organic matrix molecules that separates quantum dots one from each other in the close-packing Langmuir monolayer from quantum dots size was proposed. An existence of minimal numbers of organic matrix molecules for changing and tuning a distance



between quantum dots in the Langmuir monolayer was shown. The solutions with ratio between numbers of quantum dots and matrix molecule numbers of 1:5, 1:13, 1:26, 1:52 and 1:130 were studied. The mixed monolayers of indicated components ratio were studied by the compression isotherms method, transferred on solid glass substrates and studied via atomic force microscopy. An influence of components ratio in mixed Langmuir monolayers of quantum

dots and arachidic acid molecules on the films morphology and roughness formed based on them was shown. A minimal numbers of arachidic acid molecules required for changing a distance between quantum dots of 8 nm diameter in the close-packing Langmuir monolayer was determined as 26.

**Key words:** quantum dots, quantum dots mixed monolayers, Langmuir films.

---

**Образец для цитирования:**

Горбачев И. А., Глуховской Е. Г. Изучение влияния соотношения компонентов в смешанных монослоях квантовых точек и арахидиновой кислоты на морфологию пленок, полученных на их основе // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 299–305. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-299-305

**Cite this article as:**

Gorbachev I. A., Gluhovskoy E. G. The Studying of Components Ratio Influence in Mixed Monolayers of Quantum Dots and Arachidic Acid on the Films Morphology Based on Them. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 299–305 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-299-305

---



## БИОЛОГИЯ

УДК 616.98:579.842.23

### ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО ПОДВИДА СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЁТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ И SNP ТИПИРОВАНИЯ

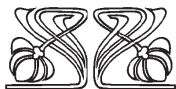
А. Н. Балыкова, Н. Ю. Носов, К. А. Никифоров, Г. А. Ерошенко

Балыкова Алина Николаевна, студент кафедры биохимии и биофизики биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, alinabalnik@gmail.com

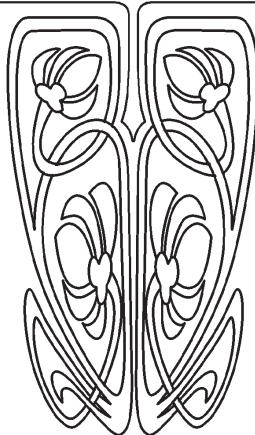
Носов Никита Юрьевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, posovnj@mail.ru

Никифоров Константин Алексеевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, nikiforov666666@mail.ru

Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, geroshenko@yandex.ru



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ



Разработаны способы дифференциации и идентификации штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени и методом SNP типирования. В работе использован 91 штамм *Y. pestis* средневекового биовара из очагов России и других стран СНГ, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Штаммы средневекового биовара представлены четырьмя уже известными филогенетическими линиями: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3. В результате проведения филогенетического анализа нами обнаружена новая филогенетическая линия, получившая название 2.MED4. Найдены 3 SNPs, маркерные для данной линии и расположенные в белок-кодирующих областях генома, с помощью которых можно установить принадлежность штаммов средневекового биовара *Y. pestis* к ветви 2.MED4. Для проведения идентификации и дифференциации штаммов средневекового биовара методом мультиплексной ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов выбраны 4 ДНК мишени: Med24, pCKF, 2.MED1, 2.MED3. В ходе исследования показана 100% специфичность данных мишеней. Комплексное использование разработанных способов ПЦР-РВ и SNP типирования обеспечивает успешную дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогенетической принадлежности.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, дифференциация штаммов, ПЦР-РВ, филогенетический анализ.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-306-311

#### Введение

Чума – природно-очаговая особо опасная инфекционная болезнь, этиологическим агентом которой является грамотрицательная бактерия *Yersinia pestis*. Чума до сих пор представляет серьёзную опасность





для общества, проявляя себя в виде вспышек и отдельных случаев заболевания [1–7].

Штаммы возбудителя чумы делятся на основную и неосновные подвиды. Высоковирулентными и эпидемически значимыми являются штаммы основного подвида [1–6]. Среди представителей основного подвида наиболее эволюционно молодой является ветвь средневекового биовара. Штаммы именно этого биовара послужили причиной крупных вспышек чумы в Поволжье в конце XVIII – начале XX в.

Представители средневекового биовара широко распространены на территории Евразии и не встречаются на других континентах. Они циркулируют в 32 из 45 природных очагов стран СНГ, в том числе в 7 из 11 очагов Российской Федерации. Штаммы этого биовара также встречаются на территории Китая, Ирана, Индии и Монголии [3, 4].

В связи с широкой распространенностью и высокой вирулентностью штаммов средневекового биовара актуальной является разработка современных способов молекулярной идентификации штаммов данного биовара, что необходимо для повышения эффективности эпидемиологического мониторинга очагов России и других стран СНГ.

Цель работы – разработка способов дифференциации штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара методом ПЦР с гибридно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и методом SNP типирования.

### Материалы и методы

Исследование проводилось в лаборатории молекулярной микробиологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Был использован 91 штамм *Y. pestis* из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». Фрагментное секвенирование проводили на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3500XL». Анализ полученных последовательностей выполняли при помощи программ Mega 7.0 и алгоритма BLAST. Полногеномное секвенирование геномов штаммов выполняли в системе Ion PGM (Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для проведения филогенетического анализа и установления популяционной структуры *Y. pestis* на основании полногеномного SNP анализа применяли эффективный биоинформационный алгоритм (Wombac 2.0, RAUP 4.0, MEGA 7.0, FigTree 1.4.3) [4]. Поиск indel-мишеней и SNP осуществляли в программах Mauve 2.4.0 и MEGA 7.0 соответственно. Для разработки способа дифференциации штаммов средневекового биовара использовали метод ПЦР с гибридно-

флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием мишеней Med24, 2.MED0, 2.MED1 и 2.MED3 [2–4]. Реакция ПЦР-РВ на мишень Med24 проводилась отдельно, другие мишени амплифицировались мультиплексно. Условия реакции для проведения ПЦР были следующими: 1 цикл 95°C 15 мин; 5 циклов 95°C 20 с, 60°C 20 с, 72°C 20 с; 30 циклов: 95°C 15 с, 58°C 45 с, 72°C 20 с.

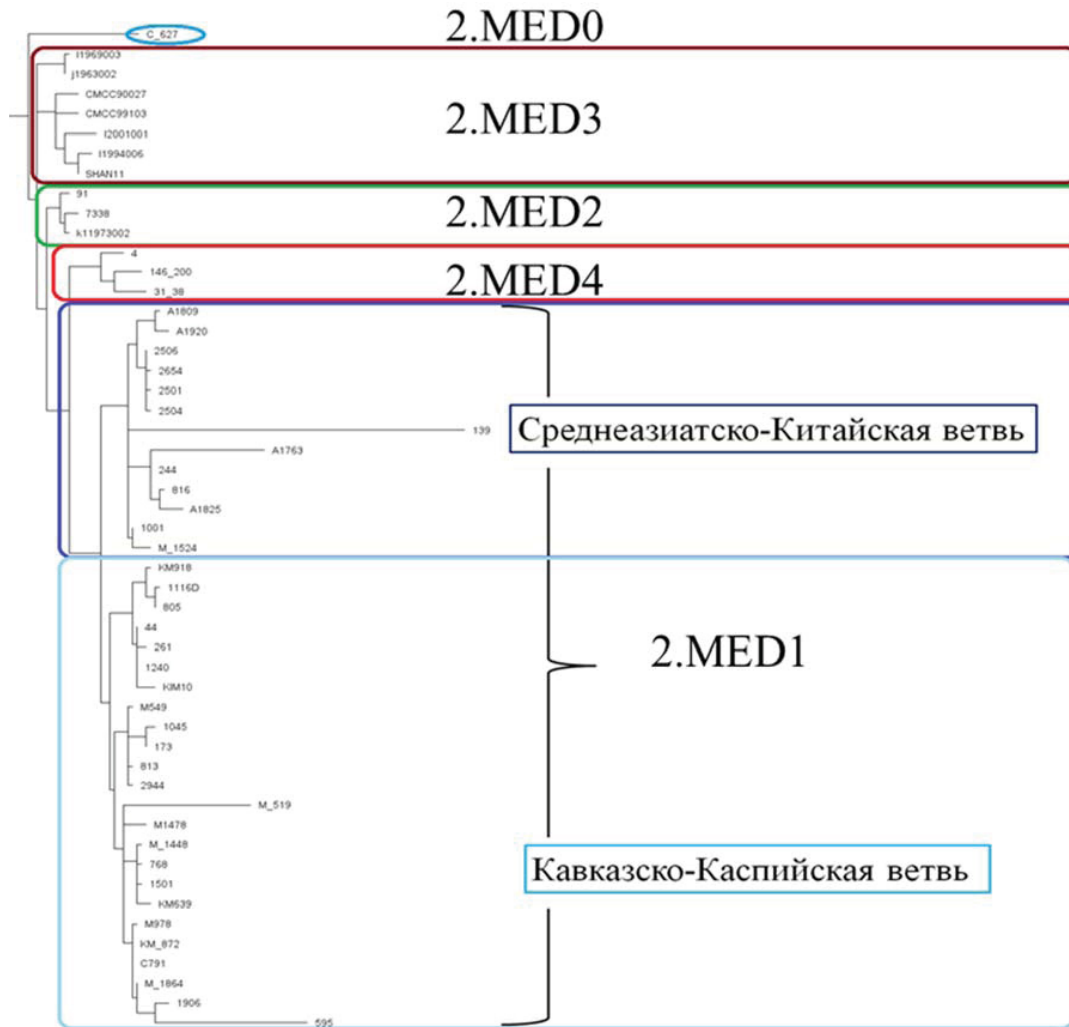
### Результаты и их обсуждение

Для проведения филогенетического анализа и определения популяционной структуры средневекового биовара выполняли полногеномный SNP анализ геномов штаммов из природных очагов РФ и сопредельных государств. Филогенетический анализ проводили с помощью метода *Maximum Likelihood* с моделью замены НКУ85 при помощи программы PhyML 3.1. В результате анализа была выявлена 1791 единичная нуклеотидная замена в коровом геноме использованных штаммов.

Как следует из дендрограммы (рисунок) штаммы средневекового биовара (2.MED) включают четыре основные филогенетические линии: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3 [3, 4].

В основании ветви 2.MED расположен штамм С-627, относящийся к ветви 2.MED0. Штаммы данной линии отличаются от других средневековых штаммов: для своего роста нуждаются в аминокислоте пролине, обладают уникальной плазмидой рСКФ и встречаются только в Центрально-Кавказском высокогорном очаге в России [2–4]. Далее от общего ствола эволюции последовательно ответвляются линии 2.MED3 и 2.MED2, штаммы которых циркулируют в некоторых провинциях Китая, граничащих со странами СНГ. Самой разнообразной филогенетической линией средневекового биовара является 2.MED1. Штаммы данной линии широко распространены на территории России, других стран СНГ, а также – в Туркмении, Грузии и других сопредельных государствах. Линия 2.MED1, как следует из дендрограммы (см. рисунок), в свою очередь, делится на два ветви: Среднеазиатско-Китайскую и Кавказско-Каспийскую в соответствии с филогеографическим принципом, что совпадает с ранее полученными результатами [3, 4].

При анализе дендрограммы впервые выявлена еще одна отдельная эволюционная линия, ранее не представленная в филогении средневекового биовара. Мы обозначили ее как 2.MED4. Эту ветвь составили три штамма (4, 146\_200, 31\_38), выделенные в разное время в очагах Кавказа и Прикаспия: Зангезуро-Карабахском и Волго-Уральском песчаном.



Филогенетический анализ и популяционная структура средневекового биовара (2.MED) по данным полно-геномного SNP анализа 117 штаммов *Y. pestis* из природных очагов РФ и сопредельных государств (метод *Maximum Likelihood* с моделью замены НКУ при помощи программы PhyML 3.1)

Для выявления штаммов средневекового биовара, которые относятся к новой филогенетической линии 2.MED4, нами был проведен поиск специфических для этой линии генетических маркеров – indel-мутаций и SNPs при помощи программ Mauve 2.4.0 и Mega 7.0.

На первом этапе проводили сравнительный анализ геномов в программе Mauve 2.4.0. По результатам данного анализа у представителей

линии 2.MED4 indel-мутаций обнаружено не было. Следующим этапом был поиск уникальных SNP's в программе Mega 7.0 при помощи функции *Phylogenetic analysis*. Нами были выбраны 3 SNPs, расположенные в белок-кодирующих областях (табл. 1). На данные мишени были рассчитаны праймеры с помощью программы Vector NTI 10 (табл. 2). Праймеры были синтезированы в РосНИПЧИ «Микроб».

Таблица 1

Выбранные маркерные SNP мишени на линию 2.MED4

Позиция маркерного SNP по геному референтного штамма <i>Y. pestis</i> CO92	Замена нуклеотида	Локус, кодируемый продукт
117694	A → G	<i>priA</i> – праймосома-связывающий белок
522489	C → A	<i>apaH</i> – диаденозин тетрафосфат
3869329	G → A	<i>phnL</i> – фосфонаты, транспортирующие АТФ-связывающий белок



Таблица 2

**Олигонуклеотидные праймеры на SNP линии 2.MED4**

Праймеры	Последовательности праймеров 5' → 3'
<i>apaH-S</i> <i>apaH-As</i>	GGGACCACGGGCAACTAAA TGGCTGCCTCGATGAAT
<i>phnL-S</i> <i>phnL-As</i>	ACGCTGCTACGCTCCCTCTA TGACTGACCCAACCGACA
<i>priA-S</i> <i>priA-As</i>	TCAGCCGTTGCAGCAGTT GGCGTTATGGATTATGGG

С их использованием методом ПЦР получали ампликоны, содержащие варибельные нуклеотиды. Амплифицированные ПЦР фрагменты секвенировали и по наличию маркерных нуклеотидов устанавливали принадлежность штаммов к ветви 2.MED4.

С помощью рассчитанных праймеров (см. табл. 2) на принадлежность к ветви 2.MED4 было проверено 12 штаммов *Y. pestis*, близких по региону и времени выделения к штаммам этой ветви. В результате удалось выявить еще два штамма (102(147) и 27(33)), относящиеся к Волго-Уральскому степному и Прикаспийскому Северо-Западному степному очагам соответственно, которые содержали все три SNPs, маркерных для 2.MED4.

Поскольку методы секвенирования требуют наличия дорогостоящего оборудования актуальным является поиск быстрых и эффективных методов идентификации и дифференциации

штаммов *Y. pestis* с помощью более доступных методов молекулярно-генетического анализа. В последнее время широкое распространение в лабораторной диагностике возбудителей инфекционных болезней получил метод ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени.

Для разработки метода идентификации и дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара методом ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов были выбраны следующие ранее найденные ДНК мишени: Med24, 2.Med0, 2.Med1 и 2.Med3 [2–4]. Ранее эти ДНК мишени были использованы в основном для разделения штаммов методом ПЦР с электрофоретическим учётом результатов.

В рамках данной работы эти ДНК мишени использовались для проведения ПЦР-РВ. На них были рассчитаны праймеры и зонды в формате TaqMan (табл. 3).

Таблица 3

**Олигонуклеотидные праймеры и зонды для дифференциации штаммов методом ПЦР-РВ**

Праймер	Последовательность праймера, зонда
2.Med1-S	AGCGGCACTCTCTACGAAAT
2.Med1-As	TGACTCCATTGAAGACGCTATTG
2.Med3-S	CCGTTGTACGATGGTGCTTT
2.Med3-As	CCGTGAGGTCTGTGGTGTAT
Med(24)-(RealTime)-S	GCCAGTGTGTGTCTAAAG
Med(24)-(RealTime)-As	CGCAACATTCGTCGCAAA
pCKF(RealTime)-S	aaccgcctaagcactttat
pCKF(RealTime)-As	cgtcaggaactcaacgaa
<b>TaqMan зонд</b>	Последовательность зонда
2.Med1-Zond	FAM-TCACCCATCGGTAAAGCAGCAGCATACGA-RTQ1
2.Med3-Zond	Cy5-TGAGCCAGTGCGCCACCACT-BHQ2
Med(24)-Zond	R6G -ACATTGTGCTGGACTCACAGCCCC- RTQ1
pCKF(RealTime)-Zond	ROX -atcagagacatttgagcggttg- BHQ2



Способ дифференциации штаммов средневекового биовара по принадлежности к филогенетическим линиям осуществляется в две реакции ПЦР-РВ: реакцию с мишенью Med24 проводят в отдельной пробирке. С мишенями 2.Med1, 2.Med3 и рСКФ проводят мультиплексную ПЦР-РВ в одной пробирке.

Принадлежность исследуемого штамма к средневековому биовару устанавливают по отсутствию сигнала флуоресценции по жёлтому каналу R6G, по которому детектируется мишень Med24. По наличию сигнала флуоресценции по оранжевому каналу ROX, по которому происходит определение мишени рСКФ, устанавливают принадлежность штаммов к линии 2.MED0. Отсутствие сигнала флуоресценции по зелёному каналу FAM по мишени 2.Med1 означает, что штамм принадлежит к линии 2.MED1. Отрицательный сигнал флуоресценции по красному каналу Cy5 по мишени 2.Med3 характерен для штаммов линии 2.MED3. Штаммы линии 2.MED2 дают сигнал флуоресценции по мишени 2.Med1 и по 2.Med3. По совокупности результатов по всем четырём ДНК-мишеням определяют принадлежность штаммов *Y. pestis* к средневековому биовару и его филогенетическим линиям (табл. 4).

В ходе исследования 91 штамма средневекового биовара показана 100% специфичность разработанного способа дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара.

Таблица 4

**Сводная таблица определения принадлежности исследуемого штамма *Y. pestis* к средневековому биовару и филогенетическим линиям**

Филогенетическая линия	ДНК мишень			
	Med24	2.Med1	2.Med3	рСКФ
2.MED0	+	+	+	+
2.MED1	-	-	+	-
2.MED2	-	+	+	-
2.MED3	-	+	-	-

### Заключение

Нами проведён анализ современной популяционной структуры штаммов средневекового биовара *Y. pestis* методом полногеномного SNP анализа и обнаружена новая филогенетическая линия 2.MED4. На данную линию найдены уникальные SNPs, с помощью которых можно проводить определение принадлежности штаммов средневекового биовара к линии 2.MED4. Также разработан способ идентификации и

дифференциации штаммов различных филогенетических линий средневекового биовара 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени. Комплексное использование разработанных способов ПЦР-РВ и SNP типирования обеспечивает дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогеографической принадлежности.

### Список литературы

1. Попова А. Ю., Кутырев В. В., Балахонов С. В., Ежлова Е. Б., Демина Ю. В. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. Вып. 4. С. 5–10.
2. Оглодин Е. Г., Одинокоев Г. Н., Никифоров К. А., Куклева Л. М., Ерошенко Г. А. Определение геновариантов штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов // Проблемы особо опасных инфекций. 2014. Вып. 4. С. 52–55.
3. Одинокоев Г. Н. Генетический анализ биохимических особенностей штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов : автореф. ... дис. канд. биол. наук. Саратов. 2010. 22 с.
4. Носов Н. Ю. Филогенетический анализ и дифференциация штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара : автореф. ... дис. канд. биол. наук. Саратов, 2017. 22 с.
5. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Dieh Il., Kusecek B., Vogler A. J., Wagner D. M., Allender C. J. W., Easterday R., Chenal-Francois V., Worsham P., Thomson N. R., Parkhill J., Lindler L. E., Carnie El., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. № 101. P. 17837–17842.
6. Morelli G., Song Y., Mazzoni C. J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D. M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A. J., Li Y., Cui Y., Thomson N. R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J. M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity // Nature Genetics. 2010. Vol. 42. P. 1140–1143.
7. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L. A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis* // PNAS. 2013. Vol. 110. № 2. P. 577–582.



**Differentiation of *Yersinia pestis* Strains of the Main Subspecies of Medieval Biovar by Real-Time PCR Method with Hybridization-Fluorescence Registration and SNP Typing**

**A. N. Balykova, N. Yu. Nosov,  
K. A. Nikiforov, G. A. Eroshenko**

Alina N. Balykova, ORCID 0000-0003-3766-7979, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, alinabalnik@gmail.com

Nikita Yu. Nosov, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, nosovnj@mail.ru

Konstantin A. Nikiforov, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, nikiforov666666@mail.ru

Galina A. Eroshenko, ORCID 0000-0001-5403-989X, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, geroshenko@yandex.ru

Methods of differentiation and identification of *Yersinia pestis* strains of medieval biovar by real-time PCR method with hybridization-fluorescent results' registration and SNP typing method have been developed. Ninety-one *Y. pestis* strains of medieval biovar from the plague foci of Russia and other CIS countries, received from the State Collection of Pathogenic Bacteria at the Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», were used in this work. The strains of medieval biovar are represented by four already known phylogenetic lines: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3. As a result of phylogenetic analysis we have discovered a new phylogenetic line, named 2.MED4. We have found 3 SNPs, which are marker for this line and located in protein-coding regions of the genome, which can be used to establish the belonging of *Y. pestis* strains of the medieval biovar to the line 2.MED4. To identify and differentiate strains of the medieval biovar by the multiplex real-time PCR method with hybridization-fluorescent results' registration, 4 DNA-targets: Med24, pCKF, 2.MED1, 2.MED3 have been selected. 100% specificity of these targets is shown. The use of a complex of the developed methods of real-time PCR and SNP typing provides a successful differentiation of strains of the medieval biovar by phylogeographic affiliation.

**Key words:** plague agent, differentiation of strains, real-time PCR, phylogenetic analysis.

**Образец для цитирования:**

Балыкова А. Н., Носов Н. Ю., Никифоров К. А., Ерошенко Г. А. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного подвида средневекового биовара методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени и SNP типирования // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 306–311. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-306-311

**Cite this article as:**

Balykova A. N., Nosov N. Yu., Nikiforov K. A., Eroshenko G. A. Differentiation of *Yersinia pestis* Strains of the Main Subspecies of Medieval Biovar by Real-Time PCR Method with Hybridization-Fluorescence Registration and SNP Typing. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 306–311 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-306-311



УДК 577.114.083

## ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИКОПОЛИМЕРОВ ПОВЕРХНОСТИ ГАЛОФИЛЬНЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *CHROMOHALOBACTER SALEXIGENS* EG1QL3 И *HALOMONAS VENTOSAE* RU5S2EL

И. М. Ибрахим, Д. А. Рыбальченко, Е. Н. Сигида,  
Ю. П. Федоненко, С. А. Коннова



Ибрахим Мохаммед Ибрахим, аспирант кафедры биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [ibrahim.egypt2016@yandex.ru](mailto:ibrahim.egypt2016@yandex.ru)

Рыбальченко Дарья Александровна, студент кафедры биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [arashis@mail.ru](mailto:arashis@mail.ru)

Сигида Елена Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, [si\\_elena@mail.ru](mailto:si_elena@mail.ru)

Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, доцент, [fedonenko\\_yu@ibppm.ru](mailto:fedonenko_yu@ibppm.ru)

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, [konnovasa@yandex.ru](mailto:konnovasa@yandex.ru)

Экстраклеточные и мембранные полисахариды галофильных бактерий вызывают интерес исследователей как перспективные биополимеры, активно участвующие в адаптации и обеспечении нормальной физиологии микроорганизмов в засоленных средах, сопутствующих многим биотехнологическим процессам. Целью настоящей работы являлось выделение, фракционирование и характеристика состава гликополимеров поверхности галофильных грамотрицательных бактерий, выделенных из образцов соли озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия) – штаммов *Chromohalobacter salexigens* EG1QL3 и *Halomonas ventosae* RU5S2EL соответственно. Бактерии культивировали в жидкой среде S-G. Экзополисахариды (ЭПС) осаждали из культуральной жидкости этанолом и фракционировали гель-проникающей хроматографией. Липополисахариды (ЛПС) экстрагировали 45% горячим водным раствором фенола из сухой биомассы. Определяли биополимерный состав ЛПС, соотношение жирных кислот липидов А и моносахаридный состав ЭПС и ЛПС. Установлено, что исследуемые культуры *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL продуцируют ЭПС с выходом 11.5 и 3 г/л соответственно. ЭПС *H. ventosae* RU5S2EL представляет собой смесь гетерополисахаридов различного состава из рамнозы, маннозы и

глюкозы, в то время как ЭПС *C. salexigens* EG1QL3 является фруктаном, гетерогенным по молекулярной массе. Анализ SDS ПААГ показал, что в ЛПС *H. ventosae* RU5S2EL преобладали S-формы молекул, а штамм *C. salexigens* EG1QL3 продуцировал R-формы ЛПС. Газожидкостная хроматография (ГЖХ) ацетилированных 2-(S)-октилгликозидов позволила обнаружить в углеводной части ЛПС обоих штаммов наличие D-глюкозы и L-рамнозы в разных соотношениях. 3-Гидроксидодекановая, гексадекановая и октадекановая кислоты были идентифицированы в качестве основных компонентов гидрофобной части ЛПС обоих штаммов. Показана перспективность штамма *H. ventosae* RU5S2EL для проведения дальнейших исследований структуры ОПС.

**Ключевые слова:** галофильные и галотолерантные микроорганизмы, экзополисахарид, липополисахарид.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-312-317

Природные и искусственные гиперсоленые среды с концентрацией солей, дважды превышающей таковую для морской воды (такие как соленые озера и испарительные пруды), встречаются на всех континентах. Для них характерно большое разнообразие аборигенной микрофлоры, адаптированной к жизни при высоких концентрациях солей, в составе которой встречаются представители архей, бактерий и эукариот [1]. Прогресс в методологии молекулярно-генетических исследований и биоинформатики существенно расширил понимание особенностей микробного метаболизма в экстремально засоленных условиях. Для ряда галофильных микроорганизмов была показана способность разлагать углеводороды и другие токсичные химические вещества, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных агентов биоремедиации различных сред от комплексных загрязнений [2, 3]. Помимо экологического аспекта использования экстремофилов эти микроорганизмы востребованы в биотехнологии. Например, галофильные гамма-протеобактерии семейства Halomonadaceae (включая представителей родов *Aidingimonas*, *Carnimonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Halomonas*, *Halotalea*, *Kushneria*, *Modicisalibacter*, *Salinicola* и *Zymbacter*) являются продуцентами солеустойчивых ферментов (амилаз, протеаз и нуклеаз), биосурфактантов и



внеклеточных полисахаридов, используемых в различных биотехнологических процессах [4–6]. Полисахариды бактериальной поверхности обладают большим потенциалом для использования в процессах извлечения нефти, фармацевтической и пищевой промышленности. Некоторые из них, связываясь с токсичными соединениями, такими как фенол, фосфорорганические соединения и другие, образующиеся при производстве либо использовании пестицидов и гербицидов, способствуют их дальнейшему разложению и, следовательно, очистке от них окружающей среды [4–6]. При этом гликополимеры могут обладать выраженной биологической активностью в отношении теплокровных животных. В связи с этим характеристика структурных особенностей гликополимеров является актуальной задачей.

Целью настоящего исследования являлось выделение, фракционирование и характеристика химического состава ЭПС и ЛПС внешних мембран двух штаммов – представителей семейства Halomonadaceae – *Chromohalobacter salexigens* EG1QL3 и *Halomonas ventosae* RU5S2EL, выделенных из образцов соли озер Карун (мухафаза Эль-Файюм, Египет) и Эльтон (Волгоградская область, Россия).

#### Материалы и методы

Объектами исследования являлись два штамма грамтрицательных галофильных бактерий *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL. Исследуемые штаммы микроорганизмов были идентифицированы нами ранее и отнесены к пограничным экстремальным галофилам (выдерживающим концентрации хлорида натрия до 15%) и слабым галофилам (до 5%) соответственно. Бактерии культивировали в модифицированной жидкой среде S-G (500 мл) с добавлением 10% NaCl в среду для *C. salexigens* EG1QL3 и 5% NaCl для *H. ventosae* RU5S2EL в литровых колбах Эрленмейера в течение 7 суток при 37°C в условиях постоянного перемешивания. Выбор концентраций соли был осуществлен на основе оптимизации условий выращивания бактерий и продукции ЭПС. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием (3500×g, 40 мин). Клетки дважды ресуспендировали 0.15 М раствором NaCl и переосаждали центрифугированием, после чего пятикратно обрабатывали ацетоном, высушивали на воздухе и мелко диспергировали. Из ацетонового порошка клеток (~4 г) выделяли ЛПС модифицированным водно-фенольным методом Вестфала без разделения фаз [7]. Культуральную жидкость концентрировали

на роторном вакуумном испарителе Laborota 4000 («Heidolph», Германия) при 40°C до объема ~100 мл, диализовали против дистиллированной воды 48 ч (диализный мешок OrDial D14, размер пор 12–14 кДа) и вновь концентрировали. ЭПС осаждали трехкратным объемом этилового спирта (–18°C, 16 ч). После центрифугирования (3500×g, 30 мин) осадок ЭПС перерастворяли в воде и вновь осаждали спиртом. Препараты ЭПС и ЛПС *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL лиофилизировали. Фракционирование ЭПС осуществляли методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose CL-4B (40×1.5 см) («GE Healthcare», США) в 25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. ЛПС подвергали мягкой кислотной деградации 2 %-ной CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (100°C, 2 ч). Выпавший осадок липида А удаляли после центрифугирования (12000×g, 20 мин), а водорастворимую часть гель-проникающей хроматографией разделяли на колонке с носителем Sephadex G-50 (55×1.5 см) («GE Healthcare», США) в пиридин-ацетатном буфере (pH 4.1). График элюции строили по оптической плотности продуктов реакции компонентов фракций с фенолом и серной кислотой при  $\lambda = 490$  нм.

Электрофорез ЛПС проводили в денатурирующих условиях с додецил-сульфатом натрия в 15% полиакриламидном геле (SDS ПААГ) [8] с последующей визуализацией продуктов разделения красителем на основе нитрата серебра [9].

Определение содержания в гликополимерах углеводов, белков, 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновой кислоты (КДО) и фосфорной кислоты проводили общепринятыми методами, описанными в работе [10]. Измерения выполняли на спектрофотометре Specord 40 («Analytik Jena AG», Германия). Определение состава жирных кислот в виде их метиловых эфиров (МЖЭК) осуществляли с помощью ГЖХ на хроматографе GC-2010 («Shimadzu», Япония). Метилирование проводили по методу, изложенному в работе [11]. Определение моносахаридного состава и установление абсолютных конфигураций сахаров проводили методом ГЖХ ацетатов полиолов и ацетилированных октил-гликозидов [12, 13]. Моносахаридный состав ЭПС также определяли методом ТСХ на алюминиевых пластинах с целлюлозным покрытием после гидролиза гликополимеров, визуализацию результатов осуществляли опрыскиванием пластин фталатом анизида. Результаты 5 независимых экспериментов (не менее 3 повторностей) подвергали статистической обработке с использованием пакета «Анализ данных» MS Excel. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.



### Результаты и их обсуждение

Из культуральной жидкости бактерий *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL были получены препараты ЭПС с выходом 11.5 и 3 г/л соответственно. Препараты ЭПС исследуемых штаммов практически не содержали белковых примесей (менее 1%). Гель-фильтрация с использованием носителя Sepharose CL-4B позволила выделить две высокомолекулярные фракции в ЭПС EG1QL3 в соотношении ~ 2.3 : 1 и три фракции в ЭПС RU5S2EL в соотношении ~ 4.5 : 1 : 5 (рис. 1). Моносахаридный анализ выделенных фракций ЭПС обоих штаммов методом ГЖХ ацетатов полиолов и ТСХ позволил идентифицировать в составе первой фракции ЭПС *H. ventosae* RU5S2EL рамнозу, маннозу и глюкозу в соотношении 1.3 : 1.1 : 1, в то время как во второй и третьей фракциях преобладала манноза. Состав моносахаридов обеих фракций ЭПС *C. salexigens* EG1QL3, выявляемый методом ГЖХ ацетатов полиолов, был идентичным, а доминирующими сахарами являлись манноза и глюкоза. Однако методом ТСХ в составе этих же препаратов была выявлена фруктоза, из которой, очевидно, в процессе пробоподготовки для анализа ГЖХ образовывались ее два энантиомера – манноза и глюкоза. Следовательно, установлено, что ЭПС

*H. ventosae* RU5S2EL представляет собой смесь гликополимеров различного строения, в то время как *C. salexigens* EG1QL3 продуцирует в качестве ЭПС гетерогенный по молекулярной массе фруктан. Синтезируемые бактериями фруктаны являются весьма востребованными биополимерами и широко используются в пищевой, химической и фармацевтической промышленности. Учитывая довольно высокий выход фруктана, бактерии *C. salexigens* EG1QL3 представляются весьма перспективным объектом для биотехнологии.

Выход препаратов ЛПС *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL составил 2.8 и 6 % от массы высушенных ацетоном клеток соответственно. Результаты электрофореза в SDS ПААГ препаратов ЛПС (рис. 2) позволили выявить преобладание в ЛПС исследуемого штамма *C. salexigens* молекул R-формы, представленных гидрофобным доменом липидом А и кором. В то же время штамм *H. ventosae* RU5S2EL продуцировал преимущественно S-формы молекул ЛПС с высокой степенью замещения корового олигосахаридом О-специфическим полисахаридом (ОПС), о чем свидетельствует характерная «лестница» на фореграмме ЛПС, обусловленная присутствием ОПС, различающихся степенью полимеризации на одно повторяющееся звено.

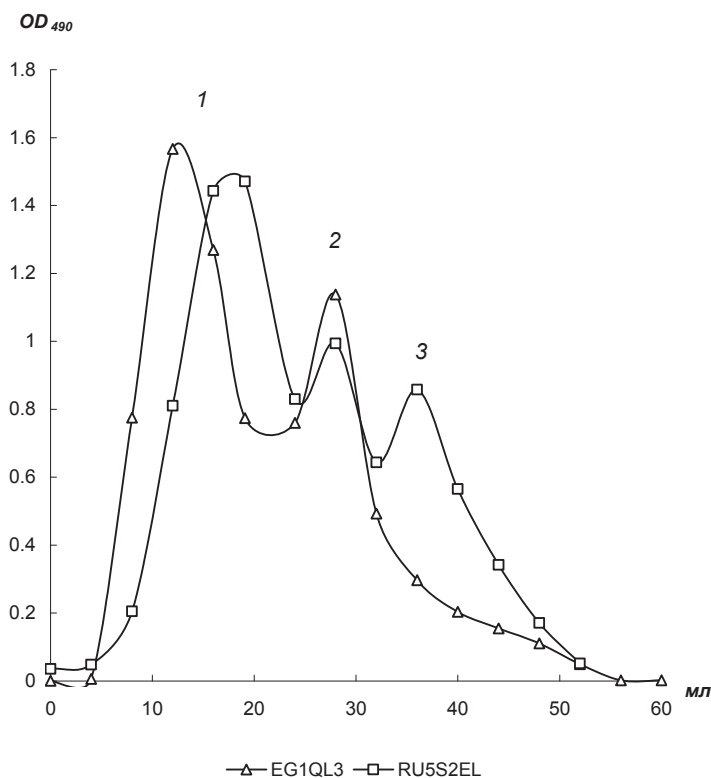


Рис. 1. Профиль элюции ЭПС *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL на колонке с Sepharose CL-4B: 1–3 – фракции ЭПС

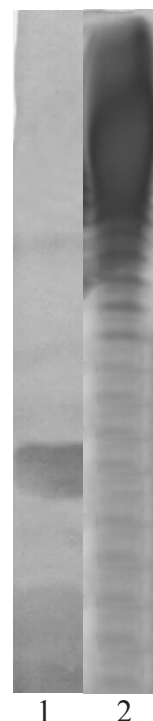


Рис. 2. Результат ДСН-ПААГ электрофореза ЛПС бактерий *C. salexigens* EG1QL3 (1) и *H. ventosae* RU5S2EL (2)





Препараты ЛПС обоих штаммов содержали все характерные для данных молекул компоненты: углеводы, в том числе и КДО, остатки 3-гидроксилированных алкановых кислот и фосфорной кислоты (таблица). Следует отметить, что в ЛПС *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL было выявлено примерно равное количество КДО. По содержанию углеводов ЛПС существенно различались, что согласовывалось с данными электрофоретического анализа. В процентном соотношении количество остатков фосфорной кислоты в ЛПС штамма EG1QL3 в 1.5 раза превышало таковое для ЛПС RU5S2EL, что также может быть обусловлено преобладанием S-форм молекул в последнем.

#### Биополимерный состав ЛПС *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL (содержание, %)

Компонент		ЛПС штамма	
		EG1QL3	RU5S2EL
Углеводы		18.3±1.6	27.9±2.5
Белок		0.71±0.06	1.4±0.1
КДО		0.33±0.01	0.30±0.04
Аосфорная кислота		1.78±0.21	1.14±0.25
МЭЖК*	3-Гидроксидодекановая	32	45
	Додекановая	–	14.8
	Гексадеценная	13.3	–
	Гексадекановая	26.4	25
	Октадеценная	27.7	15.2

Примечание. «–» – отсутствовала; \* представлено содержание (%) от суммы идентифицированных МЭЖК.

Методом ГЖХ ацетатов полиолов и октил-гликозидов в составе углеводной части ЛПС обоих штаммов были обнаружены L-рамноза и D-глюкоза, но соотношение их различалось: ~ 1 : 1.5 для ЛПС *C. salexigens* EG1QL3 и ~ 3 : 1 для ЛПС *H. ventosae* RU5S2EL.

Учитывая филогенетическое родство исследуемых штаммов, можно было ожидать близость строения гидрофобного домена ЛПС – липида А – самой консервативной части молекулы. Как известно, 3-гидроксиалкановые кислоты – маркерные компоненты ЛПС грамтрицательных бактерий, являются первичными, т.е. амидными и сложнэфирными связями присоединяются к углеводному остову липида А, чаще всего представленному димером β-D-глюкозамина, фосфорилированным в 1 и 4' положениях [14]. В обоих исследуемых ЛПС преобладающей являлась 3-ги-

дроксидодекановая кислота, а также были идентифицированы гексадекановая и октадеценная кислоты (см. таблицу). Суммарное содержание этих трех кислот в липидах А ЛПС штаммов *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL составляло 85–86% всех идентифицированных жирных кислот. Однако выделенные ЛПС отличались наличием додекановой кислоты (~15%) у штамма RU5S2EL и гексадеценной кислоты (~15%) у штамма EG1QL3.

Исследуемые ЛПС были подвергнуты мягкой кислотной деградации с последующей гель-фильтрацией водорастворимой углеводной части (рис. 3). В результате были получены фракции ОПС и коровых олигосахаридов, по выходу которых ЛПС *H. ventosae* RU5S2EL и *C. salexigens* EG1QL3 сильно различались.

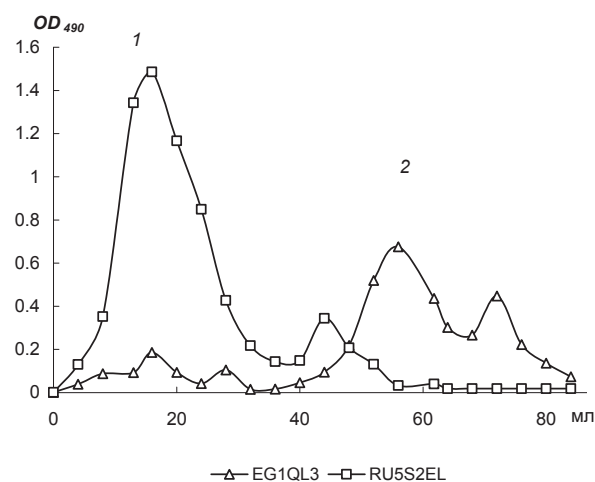


Рис. 3. Профиль элюции углеводных компонентов ЛПС *C. salexigens* EG1QL3 и *H. ventosae* RU5S2EL на колонке с Sephadex G-50: 1 – фракции ОПС, 2 – фракции корового олигосахариды

Для штамма *H. ventosae* RU5S2EL выход ОПС и корового олигосахариды составил 40% и 13.5% от массы ЛПС, в то время как для ЛПС штамма *C. salexigens* EG1QL3 выход этих фракций составил 2.5 и 28%. Эти данные хорошо согласуются с результатами электрофоретического разделения и анализа биополимерного состава. Таким образом, показана перспективность штамма *H. ventosae* RU5S2EL для проведения дальнейших исследований структуры ОПС.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам Центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН за возможность выполнения анализов ГЖХ.



## Список литературы

1. Oren A. Halophilic microbial communities and their environments // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. Vol. 33. P. 119–124.
2. Zhuang X., Han Z., Bai Z., Zhuang G., Shim H. Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil // *Environ. Pollut.* 2010. Vol. 158(5). P. 1119–1126.
3. Castillo-Carvajal L. C., Sanz-Martín J. L., Barragán-Huerta B. E. Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review // *Environ. Sci. Pollut. Res. Intern.* 2014. Vol. 21 (16). P. 9578–9588.
4. Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. Vol. 62. P. 504–544.
5. Ventosa A., Nieto J. J. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1995. Vol. 11. P. 85–94.
6. Margesin R., Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology // *Extremophiles.* 2001. Vol. 5. P. 73–83.
7. Кульшин В. А., Яковлев А. П., Аваева С. Н., Дмитриев Б. А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий // *Мол. генетика, микробиол. и вирусол.* 1987. № 5. С. 44–46.
8. Hitchcock P. J., Brown T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 154. P. 269–277.
9. Tsai C. M., Frasch C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1982. Vol. 119. P. 115–119.
10. Konnova S. A., Makarov O. E., Skvortsov I. M., Ignatov V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interaction // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. Vol. 118. P. 93–99.
11. Mayer H., Tharanathan R. N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria // *Methods Microbiol.* 1985. Vol. 18. P. 157–207.
12. Sawardecker J. S., Sloneker J. H., Jeans A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // *Anal. Chem.* 1965. Vol. 37. P. 1602–1603.
13. Leontein K., Lindberg B., Lönngren J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols // *Carbohydr. Res.* 1978. Vol. 62. P. 359–362.
14. Molinaro A., Holst O., Di Lorenzo F., Callaghan M., Nurisso A., D'Errico G., Zamyatina A., Peri F., Berisio R., Jerala R., Jimenez-Barbero J., Silipo A., Martin-Santamaria S. Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity // *Chemistry.* 2015. Vol. 21 (2). P. 500–519.

## Characterization Surface Glycopolymers from Halophilic Gram-Negative Bacteria *Chromohalobacter salexigens* 1QL3 and *Halomonas ventosae* S5(2)

I. M. Ibrahim, D. A. Rybal'chenko, E. N. Sigida, Yu. P. Fedonenko, S. A. Konnova

Ibrahim M. Ibrahim, ORCID 0000-0002-5374-3508, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia; Fayoum University, Egypt, Fayoum, POBox: 63514 (Egypt), ibrahim.egypt2016@yandex.ru

Darya A. Rybal'chenko, ORCID 0000-0002-3117-8229, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, arashis@mail.ru

Elena N. Sigida, ORCID 0000-0002-9223-4589, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, si\_elena@mail.ru

Yulia P. Fedonenko, ORCID 0000-0003-0255-8190, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, fedonenko\_yu@ibppm.ru

Svetlana A. Konnova, ORCID 0000-0002-9607-8173, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia; Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, konnovasa@yandex.ru

Extracellular and membrane polysaccharides of halophilic bacteria arouse the interest of researchers as promising biopolymers involved in adaptation and maintenance of normal physiology of microorganisms in saline environments that accompany many biotechnological processes. This work aimed at structural characteristic of surface glycopolymers of halophilic Gram-negative bacteria isolated from the salt samples of the lakes Qarun (Egypt) and Elton (Russia) – strains *Chromohalobacter salexigens* EG1QL3 and *Halomonas ventosae* RU5S2EL, respectively. The strains were cultured in a liquid S-G medium. Exopolysaccharides (EPS) were precipitated from the culture liquid with ethanol and fractionated by gel-permeation chromatography. Lipopolysaccharides (LPS) were extracted from dry biomass by Westphal method. Biopolymer composition of the LPS, fatty acid composition of lipids A, and the monosaccharide composition of the EPS and LPS were determined. It was found that *C. salexigens* EG1QL3 and *H. ventosae* RU5S2EL produce EPS with a yield of 11.5 and 3 g/L, respectively. The EPS of *H. ventosae* RU5S2EL is a mixture of the heteropolysaccharides from rhamnose, mannose and glucose, while *C. salexigens* EG1QL3 EPS is a fructan heterogeneous in molecular weight. SDS PAGE analysis showed that in the LPS from *C. salexigens* EG1QL3 R-forms prevailed, while in *H. ventosae* RU5S2EL LPS S-forms were predominant. GLC of acetylated 2-(S)-octylglycosides demonstrated that the LPS of both strains contained D-glucose and L-rhamnose in a different ratio. 3-Hy-



droxydodecanoic, hexadecanoic and octadecenoic acids were identified among the main components of the hydrophobic part of the LPS of both strains. The LPS from *H. ventosae* RU5S2EL is promising for further research on the structure of OPS.

**Key words:** halophilic and halotolerant bacteria, exopolysaccharides, lipopolysaccharides.

**Acknowledgements:** Authors thank the staff of the “Symbioz” center for the collective use of research equipment Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS) for GLC analysis.

---

**Образец для цитирования:**

Ибрагим И. М., Рыбальченко Д. А., Сигида Е. Н., Федоненко Ю. П., Коннова С. А. Характеристика гликополимеров поверхности галофильных грамотрицательных бактерий *Chromohalobacter salexigens* EG1QL3 и *Halomonas ventosae* RU5S2EL // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 312–317. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-312-317

**Cite this article as:**

Ibrahim I. M., Rybal'chenko D. A., Sigida E. N., Fedonenko Yu. P., Konnova S. A. Characterization Surface Glycopolymers from Halophilic Gram-Negative Bacteria *Chromohalobacter salexigens* 1QL3 and *Halomonas ventosae* S5(2). *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 312–317 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-312-317

---



УДК 579.61

## ВОЗМОЖНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ О-АГ В ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ С ПОМОЩЬЮ ДОТ-АНАЛИЗА



С. А. Воробьева, О. С. Дуракова, О. А. Волох, О. В. Громова

Воробьева Светлана Александровна, магистрант кафедры микробиологии и физиологии растений, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Vorobeva-Svetlana2018@yandex.ru

Дуракова Оксана Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, durakova92@list.ru

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующий отделом профилактических препаратов, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, lhv@microbe.ru

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, gromova.o.64@gmail.com

Холера остается глобальной угрозой для общественного здравоохранения. Даже спорадические случаи завоза инфекции наносят весомый социально-экономический ущерб. В связи со сложившейся ситуацией важную роль в снижении заболеваемости играет разработка и усовершенствование современных безопасных химических вакцин против холеры, вызванной *V.cholerae* O1 и O139 серогрупп, что является важным и перспективным направлением научных исследований.

**Ключевые слова:** дот-иммуноанализ, коллоидное золото, холерная химическая вакцина, О-антиген.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319

### Введение

На территории Российской Федерации лицензирована вакцина холерная бивалентная химическая, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и состоящая из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава. Для характеристики качества и методов контроля специфической активности О-антигена *V.cholerae* как в полуфабрикате вакцины (фракции), так и в готовом препарате (таблетке) в настоящее время используют серологические методы, которые основаны на антигенной активности в реакции непрямой гемагглютинации и в реакции диффузионной преципитации в геле. Постановка данных реакций достаточно трудоемка и длительна по времени, а в случае реакции диффузной преципитации (РДП) малоинформативна. Так как отсутствуют коммерческие наборы по определению специфической активности О-антигена,

то актуален вопрос о разработке и внедрении новых экспрессных методов контроля в процессе производства вакцины. Быстротой, технической простотой и высокой чувствительностью обладает вариант твердофазного иммуоферментного анализа – дот-иммуноанализ (ДИА). В связи с этим целью настоящего исследования являлось изучение возможности применения дот-иммуноанализа для оценки активности О-антигена в полуфабрикате вакцины и готовом препарате холерной химической вакцины.

### Материалы и методы

В качестве антигенных препаратов использовали лиофилизированные специфически стерильные полуфабрикаты холерной вакцины, выделенные из культуральной жидкости путем концентрирования и осаждения серноокислым аммонием. В состав готовой лекарственной формы входят лиофилизированные О-антигены и наполнитель (сахароза, стеарат кальция, тальк и крахмал). Постановка дот-иммуноанализа осуществлялась в двух вариантах: с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного наночастицами коллоидного золота диаметром 15–17 нм, и вариант дот-ИФА с антиновыми антителами, меченными пероксидазой.

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы мы провели анализ 15 отобранных образцов специфических фракций О-антигена (концентрация 5 мг/мл) с помощью методов дот-иммуноанализа, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и РДП. Результаты, полученные двумя методами дот-иммуноанализа, представляют средние показатели трех определений. Полученные нами данные в некоторых случаях разнятся, причем методика с использованием белка А, меченного коллоидным золотом, показывает больший титр антигена в образце, что может быть связано с большей чувствительностью метода за счет свойств коллоидного золота. Коэффициент корреляции с данными РНГА составляет 0,79, тогда как второй методики 0,58. Для дополнительного количественного учета концентрации антигенов



в исследуемых пробах пользовались денситометрической оценкой реакционных зон с помощью «Универсальной компьютерной программы для количественного учета биохимических реакций» и рассчитали минимальную концентрацию антигена в специфических фракциях, обнаруженную с помощью дот-анализа с белком А, равную 3,92 мкг.

Поскольку ДИА с коллоидным золотом показал большую чувствительность, то на следующем этапе работы мы использовали именно эту методику для определения активности О-антигена в готовой лекарственной форме. Для анализа использовали 5 серий готовой таблетированной химической холерной вакцины. Полученные результаты говорят о том, что ДИА с белком А и коллоидным золотом способен выявлять О-антиген в готовой лекарственной форме вакцины. Коэффициент корреляции с данными РНГА 0,76. Важно, что данный метод не требует сложной пробоподготовки, поскольку наполнители химической вакцины отрицательно влияют на показатели активности антигенов, для проведения РНГА разработана трудоемкая пробоподготовка, включающая щелочной гидролиз растворенной таблетки, тогда как в данной методике она заключается лишь в центрифугировании нативного раствора таблетки при малых оборотах.

### Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами доказана возможность применения дот-иммуноанализа для оценки активности О-антигена в полуфабрикате вакцины и готовом препарате, а также нами впервые предлагается

применять ДИА с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А и коллоидного золота для определения специфических антигенов таблетированной холерной вакцины. Полученные нами данные при постановке дот-анализа в двух вариантах коррелируют с результатами уже используемых в производстве методов оценки активности О-АГ.

### Possibility of Determination of Specific Activity of O-Ag in the Production of Cholera Chemical Vaccine by Dot-Analysis

S. A. Vorobeva, O. S. Durakova,  
O. A. Volokh, O. V. Gromova

Svetlana Vorobyova, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, Vorobeva-Svetlana2018@yandex.ru

Oksana S. Durakova, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, durakova92@list.ru

Oksana A. Volokh, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, lhv@microbe.ru

Olga V. Gromova, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, gromova.o.64@gmail.com

Cholera remains a global threat to public health. Even sporadic cases of importation of the infection cause significant socio-economic damage. In connection with the current situation, the development and improvement of modern safe chemical vaccines against cholera caused by *V. cholerae* O1 and O139 serogroups plays an important role in reducing the incidence, which is an important and promising direction of scientific research.

**Key words:** dot-immunoassay, colloidal gold, cholera chemical vaccine, O-antigen.

---

### Образец для цитирования:

Воробьева С. А., Дуракова О. С., Волох О. А., Громова О. В. Возможность определения специфической активности О-АГ в производстве холерной химической вакцины с помощью дот-анализа // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 318–319. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319

### Cite this article as:

Vorobeva S. A., Durakova O. S., Volokh O. A., Gromova O. V. Possibility of Determination of Specific Activity of O-Ag in the Production of Cholera Chemical Vaccine by Dot-Analysis. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 318–319 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-318-319

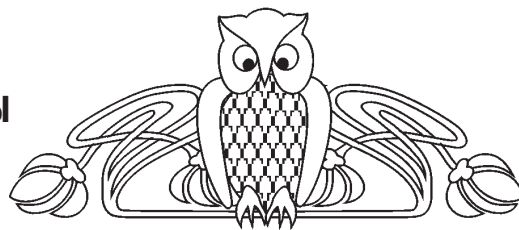
---



УДК 581.6:601

## ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

Б. М. Х. Хумуд, Н. В. Апанасова, О. И. Юдакова



Хумуд Бутхайна Мохаммед Хумуд, аспирант кафедры генетики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, bobogold18@gmail.com

Апанасова Наталия Владимировна, инженер отдела научных исследований № 1 Управления научной деятельностью, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, arapasova.natasha@mail.ru

Юдакова Ольга Ивановна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой генетики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, yudakovaoi@info.sgu.ru

В настоящее время многие селекционные технологии строятся на использовании в качестве исходного материала гаплоидных растений. Однако спонтанная частота их образования крайне низкая (0,01–0,1%). В связи с этим актуально получение форм культурных растений, склонных к партеногенезу. На кафедре генетики Саратовского государственного университета создана коллекция линий кукурузы с повышенной частотой образования в потомстве гаплоидных растений. Поддержание растительных коллекций в полевых условиях сопровождается высокими затратами, тогда как современные технологии *in vitro* дают возможность более эффективно организовать работу по сохранению гермоплазмы. Целью исследования явилась разработка технологии клонального микроразмножения растений линий кукурузы для создания в дальнейшем коллекции асептических культур партеногенетических форм. В качестве первичного экспланта использовали зрелые зародыши, которые вычленили из зерновок, обработанных коммерческим препаратом «Белизна» в разведении 1:1 в течение 5 мин. Наиболее эффективной для этапа инициации стерильной культуры оказалась среда, состоящая только из агара и воды, а для этапа собственно микроразмножения – среда MS, дополненная БАП 0.5 мг/л.

**Ключевые слова:** клональное микроразмножение, культивирование *in vitro*, эмбриокультура, партеногенез, кукуруза.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324

Гаплоиды, или особи с одинарным набором хромосом, являются ценным материалом для решения различных прикладных и фундаментальных научных проблем. Использование гаплоидов в селекции позволяет быстро оценивать растения по генотипу и эффективно осуществлять работы по экспериментальному мутагенезу, проводить отбор в первом поколении на провокационном фоне, быстро создавать гомозиготные чистые линии путем диплоидизации гаплоидов и др. [1]. Частота спонтанного развития в потомстве

гаплоидных растений крайне низкая. Например, у кукурузы она составляет 1:1000 [2]. Даже с использованием современных методов индукции гаплоидии, ее частоту удастся увеличить всего лишь с сотых долей до нескольких процентов [3–9]. Решение проблемы повышения эффективности индукции гаплоидии осложняет недостаточная изученность генетических механизмов партеногенеза. Модельным объектом для исследования данных механизмов, а впоследствии и донором генетических факторов партеногенеза могут стать линии со стабильно наследуемой повышенной частотой образования гаплоидов. Путём отбора и целенаправленной селекции на кафедре генетики Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского была создана коллекция гомозиготных линий кукурузы, предрасположенных к наследуемому партеногенезу [9–13]. Поддержание растительных коллекций в полевых генных банках высокочрезвычайно, для них необходимы большие площади, тщательный и своевременный уход с использованием ручного труда. Современные технологии *in vitro* дают возможность более эффективно организовать работу по созданию и сохранению гермоплазмы. Они позволяют продолжительно хранить и мультиплицировать растительный материал в асептических условиях, освобождать его от вирусных, бактериальных, грибных заболеваний, при этом экономить площади под коллекциями и затраты труда для их поддержания. В связи с этим актуальным является создание и развитие коллекции асептических культур растений партеногенетических линий кукурузы.

Накопленный к настоящему времени опыт размножения растений в культуре *in vitro* свидетельствует о невозможности создания одной универсальной технологии клонирования, так как эти технологии зависят не только от вида растения, но часто и от конкретного генотипа. Целью данного исследования явилась разработка технологии клонального микроразмножения растений партеногенетических линий кукурузы. В задачи первого этапа входило:

- 1) подбор метода стерилизации растительного материала для введения в стерильную культуру зрелых зародышей кукурузы;



2) тестирование питательных сред различного минерального и фитогормонального состава для инициации стерильной культуры.

### Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужили две линии кукурузы АТ-ТМ (bm,wx,y) и АТ-ТМ (lg, y), которые склонны к наследуемому партеногенезу и регулярно дают в потомстве матроклинные гаплоиды [10–13].

В качестве первичных эксплантов использовали зрелые зародыши, которые выделяли с помощью препаровальных игл из обработанных стерилизующими растворами зерновок. В качестве стерилизующих агентов использовали коммерческий препарат «Белизна» (действующее вещество – гипохлорит натрия), синтетическое моющее средство (СМС) и препарат «Фундазол» в разных сочетаниях и с разной экспозицией. Всего было протестировано 6 вариантов стерилизации: 1) «Белизна» (в разведении 1:1), 5 мин; 2) «Белизна» (1:1), 10 мин; 3) «Белизна» (1:1), 20 мин; 4) «Белизна» (1:1), 5 мин, СМС 1%, 15 мин; 5) «Белизна» (1:1), 15 мин, СМС 1%, 20 мин; 6) «Фундазол» 1%, 5 мин.

Для инициации культуры зрелых зародышей использовали среды: агар–вода и Мурасиге–Скуга, MS [14], с добавлением витаминов по прописи среды, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара (Panreac). В качестве индуктора морфогенеза использовали 6-бензиламинопурин (БАП). рН сред корректировали до 5,8–6,0 до автоклавирования. Среду автоклавировали 20 мин при 120°C. Этапы инициации стерильной культуры проводили в

чашках Петри, этапы размножения – в стеклянных колбах объемом 200 мл. В чашки Петри и колбы добавляли по 25 мл питательной среды. Культуры выращивали в климатоканере Sanyo MLR-352 при температуре 24°C при 16-часовом фотопериоде.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2010.

### Результаты и их обсуждение

Оптимальная процедура стерилизации должна давать наименьшее количество инфицированного растительного материала и при этом не снижать его жизнеспособность. Обработанные стерилизующими агентами зерновки кукурузы помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и через 7 сут. определяли размер проростков и количество инфицированных зерновок. Эффективными для обеих линий оказались варианты стерилизации 1, 2 и 6 («Белизна» 5 мин; «Белизна» 10 мин; «Фундазол» 5 мин) (рис. 1). Однако линия АТ-ТМ (lg, y) была более чувствительна к стерилизующим растворам, и в некоторых вариантах предобработка семян угнетала процессы их прорастания. В частности, во втором варианте изученные линии достоверно отличались по длине проростков (рис. 2). Таким образом, наиболее эффективными для обеих линий можно считать вариант 1 и 6. В дальнейшей работе для стерилизации растительного материала использовали вариант 1 («Белизна» в разведении 1:1, 5 мин) как наиболее доступный и простой в использовании.

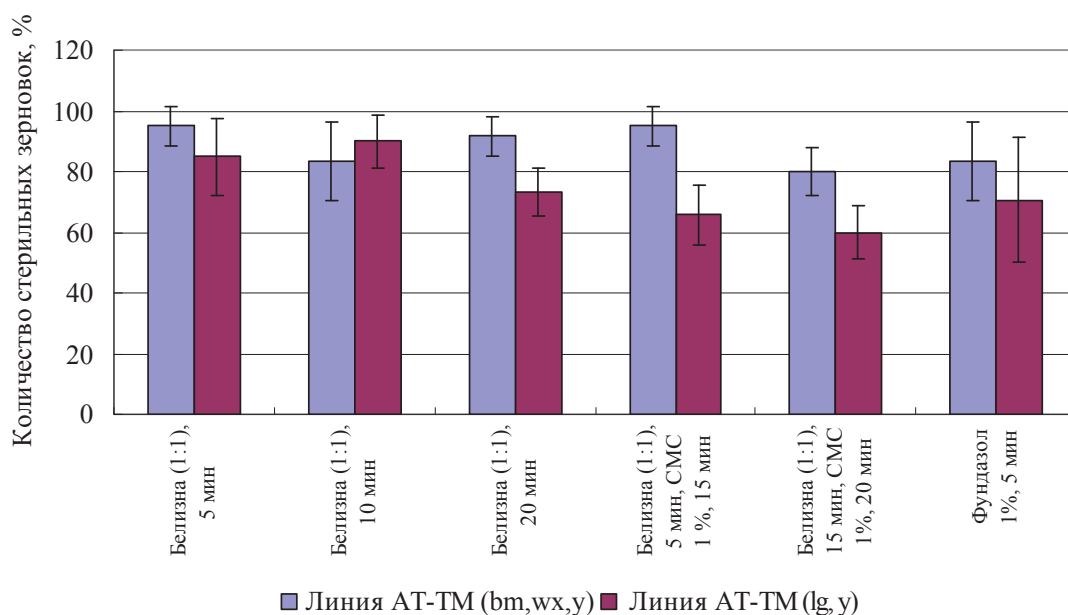


Рис. 1. Эффективность разных вариантов стерилизации зерновок кукурузы через 7 сут. после обработки

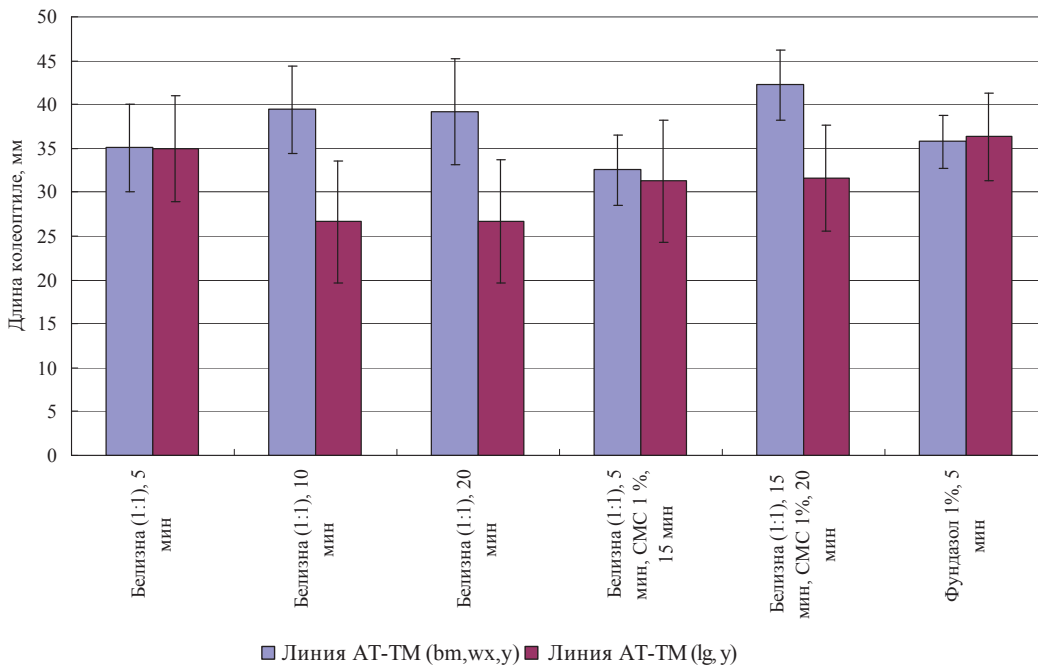


Рис. 2. Длина coleoptиле проростков кукурузы на 7-е сут. после обработки зерновок стерилизующими растворами

Для инициации стерильной культуры было апробировано три состава искусственных сред: 1) агар–вода; 2) среда MS без добавления гормонов; 3) среда MS, дополненная БАП в концентрации 0,5 мг/л.

На всех питательных средах изолированные зародыши прорастали с частотой около 90%. Однако на средах MS у проростков наблюдалась витрификация тканей и различные морфозы (недоразвитие coleoptиле, закручивание листьев и изменение их формы) (рис. 3, б). Вследствие этого для инициации стерильной культуры был выбран

способ проращивания зрелых зерновок на среде, состоящей только из агара и воды.

После того как проростки достигали величины 2–3 см, у них удаляли корень и переносили на среды для собственно микроразмножения. На данном этапе важно подобрать такой состав питательных сред, которые снимали бы апикальное доминирование, стимулировали образование побегов из пазушных меристем, но при этом подавляли развитие корней. Как известно, образование корней обычно препятствует мультпликации побегов.

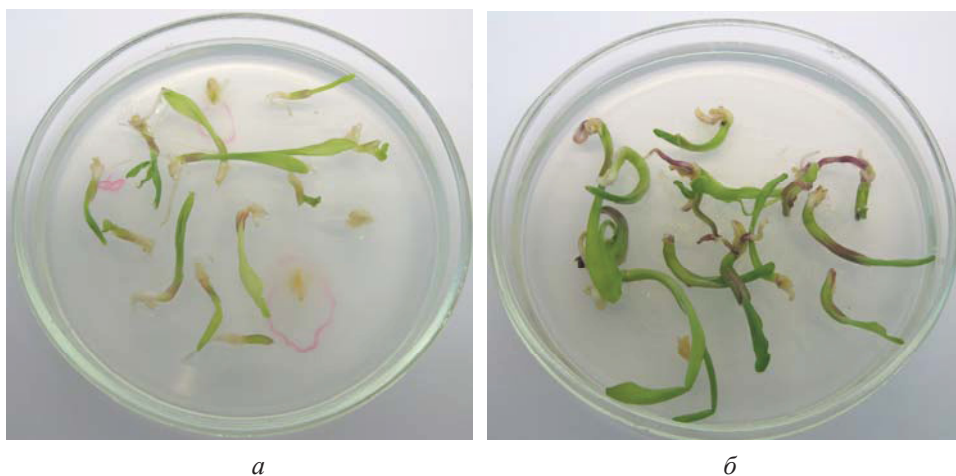


Рис. 3. Влияние состава питательной среды на проращивание зрелых зародышей кукурузы (через 7-е сут. от начала культивирования): а – нормальные проростки на среде агар–вода; б – проростки с закрученными листьями на среде MS без добавления гормонов





Было протестировано 3 варианта сред: 1) MS без гормонов; 2) MS, дополненная БАП в концентрации 0.5 мг/л; 3) 1/2MS, дополненная БАП в концентрации 0.5 мг/л. На безгормональной среде наблюдался активный рост побега, апикальное доминирование и развитие корня (рис. 4, а). На среде 1/2MS БАП 0.5 мг/л корни отсутствовали, но

рост побега был замедлен, и пазушные побеги не развивались (см. рис. 4, б). Наиболее эффективной оказалась среда MS БАП 0.5 мг/л. В этом варианте у эксплантов не формировались корни, побеги были несколько укорочены и в базальной части первичного побега происходило развитие пазушных меристем в боковые побеги (см. рис. 4, в).

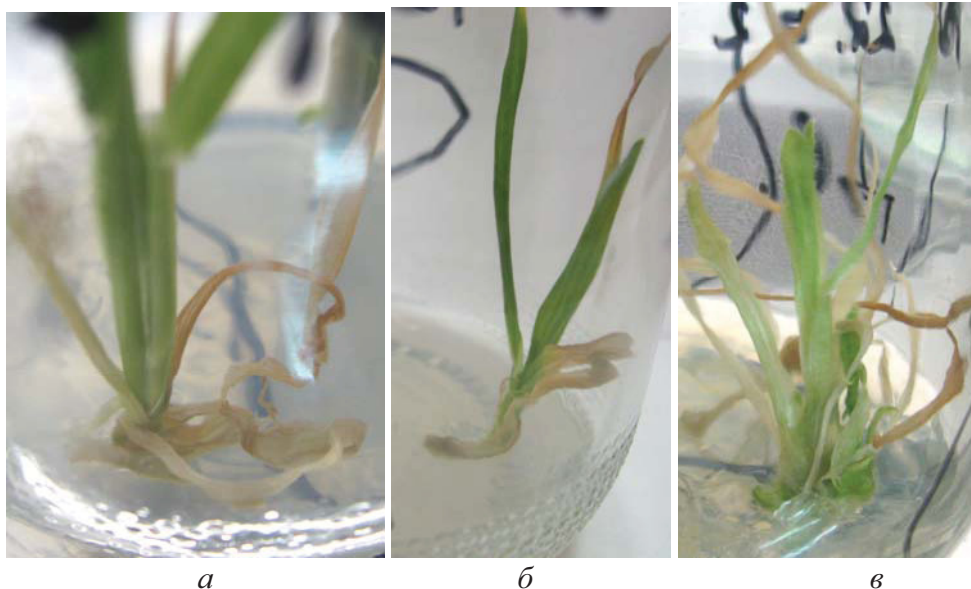


Рис. 4. Влияние состава питательной среды на развитие проростков кукурузы через 1 месяц культивирования: а – апикальный рост побега и образование корней у проростков на среде MS без добавления гормонов; б – апикальный рост побега без корней на среде MS, дополненной БАП 0.5 мг/л; в – образование побегов из пазушных меристем на среде 1/2 MS, дополненной БАП 0.5 мг/л

Таким образом в ходе проведенного исследования были подобраны эффективные варианты стерилизации растительного материала и среды для инициации стерильной культуры зрелых зародышей и мультимпликации побегов.

#### Благодарности

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности по заданию № 6.8789.2017/БЧ.

#### Список литературы

1. Тырнов В. С. Гаплоидия у растений : научное и прикладное значение. М., 1998. 54 с.
2. Chase S. S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.) // Bot. Rev. 1969. Vol. 35, № 2. P. 117–168.
3. Суханов В. М., Тырнов В. С. Получение гаплоидов *in vitro* из гаметических клеток // Гаплоидия и селекция. Саратов, 1976. С. 99–110.
4. Лантев Ю. П. Гетероплоидия в селекции растений. М., 1984. 248 с.

5. Круглова Н. Н. Микроспора как модельная система для изучения путей морфогенеза : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Уфа, 2002. 48 с.
6. Дьячук Т. И. Технологические и селекционные аспекты гаплоидии (на примере пшеницы и ячменя) : дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 2003. 290 с.
7. Dwivedi S. L., Britt A. B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H. D., Ortiz R. Haploids : Constraints and opportunities in plant breeding // Biotechnology Advances. 2015. Vol. 33. P. 812–829.
8. Hu H., Schrag T. A., Peis R., Unterseer S., Schipprack W., Chen S., Lai J., Yan J., Prasanna B. M., Nair S. K., Chaikam V., Rotarencu V., Shatskaya O. A., Zavalishina A., Scholten S., Schön C. C., Melchinger A. E. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method // Genetics. 2016. Vol. 202. P. 1267–1276.
9. Еналеева Н. Х., Тырнов В. С. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272, № 3. С. 722–725.
10. Апанасова Н. В., Юдакова О. И. Коллекция генетически маркированных линий кукурузы с повышенной частотой партеногенеза // 50 лет ВОГиС : успехи и перспективы : тез. Всерос. конф. (Москва, 8–10 нояб. 2016 г.). М., 2016. С. 72.



11. Гуторова О. В., Апанасова Н. В., Юдакова О. И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самар. науч. центра Российской академии наук. 2016. Т. 18, № 2(2). С. 341–344.
12. Апанасова Н. В., Смолькина Ю. В., Юдакова О. И. Проявление признаков партеногенеза у кукурузы в различной генотипической среде // Селекция растений : прошлое, настоящее и будущее : сб. материалов I Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 140-летию НИУ «БелГУ» и 100-летию со дня рождения селекционера, ученого и педагога, доктор сельскохозяйственных наук, профессора З. И. Щелоковой (Белгород, 24–26 ноября 2016 г.) / под общ. ред. Е. В. Думачевой. Белгород, 2017. С. 9–12.
13. Апанасова Н. В., Гуторова О. В., Юдакова О. И., Смолькина Ю. В. Особенности строения и развития женских генеративных структур у линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самар. науч. центра Российской академии наук. 2017. Т. 19, № 2 (2). С. 216–219.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.

#### Introduction to Culture *in vitro* of Corn Parthenogenetic Lines

B. M. H. Humood, N. V. Apanasova, O. I. Yudakova

Buthaina M. H. Humood, ORCID 0000-0001-9509-8562, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, bobogold18@gmail.com

#### Образец для цитирования:

Хумуд Б. М. Х., Апанасова Н. В., Юдакова О. И. Введение в культуру *in vitro* партеногенетических линий кукурузы // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 320–324. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324

#### Cite this article as:

Humood B. M. H., Apanasova N. V., Yudakova O. I. Introduction to Culture *in vitro* of Corn Parthenogenetic Lines. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 320–324 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324

Natalia V. Apanasova, ORCID 0000-0002-5496-0862, Saratov State University, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, apanasova.natasha@mail.ru

Olga I. Yudakova, ORCID 0000-0003-1391-6803, Saratov State University, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, yudakovaoi@info.sgu.ru

Many modern selection technologies are based on the use of haploid plants as a starting material. The spontaneous frequency of haploid development is very low (0.01–0.1%). In this regard, the creation of plant forms with increased frequency of parthenogenesis is important. The collection of corn lines with an increased frequency of haploid plants in the progeny was created at the Department of Genetics of the Saratov State University. High costs are required for maintain of a plant collections in the field. Modern *in vitro* technologies allow more efficient organize the works on creation and preservation of germplasm. The aim of the study is the introduction of plants of parthenogenetic lines into a culture *in vitro* to create a collection of aseptic cultures of parthenogenetic maize forms. Mature embryos were used as a primary explants. Embryos were isolated from the grains, treated by the commercial preparation "Belizna" in a dilution of 1:1 within 5 minutes. The most effective medium on the stage of initiation of a sterile culture was a medium consisting only of agar and water. The MS medium supplemented with BAP 0.5 mg/l was a most effective on the stage of micropropagation.

**Key words:** micropropagation, *in vitro*, embryoculture, parthenogenesis, corn, *Zea mays* L.

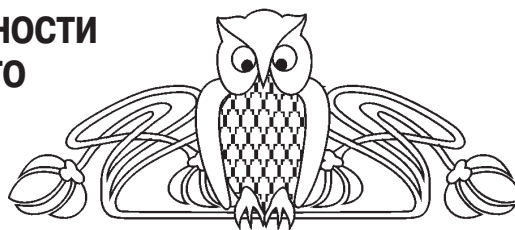
**Acknowledgments:** The work was carried out with the partial financial support of the Ministry of Education and Science of Russia within the framework of the basic part of the state task in the sphere of scientific activity on the assignment no. 6.8789.2017/BCh.



УДК 616.98:579.842.23

## АНАЛИЗ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ПРОСТЕЙШИХ ИЗ ПОЧВ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

М. А. Макашова, Е. Г. Оглодин, К. А. Никифоров,  
Н. А. Шарапова, Г. А. Ерошенко



Макашова Марина Александровна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, makashova1@gmail.com

Оглодин Евгений Геннадьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, e.oglodin@rambler.ru

Никифоров Константин Алексеевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, nikiforov666666@mail.ru

Шарапова Наталия Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, podbor\_nat@mail.ru

Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, geroshenko@yandex.ru

Характеристика видового состава доминирующих представителей простейших в природных очагах чумы важна для изучения некоторых сторон экологии и механизмов персистенции *Yersinia pestis*. Для определения систематической принадлежности амёб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы нами проведен анализ нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов этих простейших, выделенных на территории очага в 2016 г. Анализируемые участки рибосомальных генов получали с использованием специфичных праймеров методом ПЦР с последующим секвенированием ПЦР продуктов. Анализ данных фрагментарного секвенирования осуществляли выравниванием полученных нуклеотидных последовательностей на референсные нуклеотидные последовательности простейших из базы данных NCBI GenBank. Филогенетический анализ проводили с использованием программ Mega 7.0, Ugene 1.28.1 алгоритмом Maximum Likelihood. В результате установлена систематическая принадлежность простейших, выделенных из разных эпизоотических по чуме участков почв Горного Алтая, к видам *Acanthamoeba bacastellanii*, *Dictyostelium sphaerocephalum* и *D. mucoroides*. В совокупности с данными о высокой численности выделенных штаммов амёб и способности *Yersinia pestis* сохраняться в клетках этих простейших можно рассматривать идентифицированные виды амёб в качестве вероятных природных резервуаров чумы. Выделенные штаммы амёб могут быть использованы в качестве

модельных объектов при изучении особенностей экологии и механизмов сохранения возбудителя чумы в почвенных биоценозах нор грызунов природных очагов чумы.

**Ключевые слова:** Простейшие, *Acanthamoeba*, *Dictyostelium*, почвенный биоценоз, Горно-Алтайский высокогорный очаг чумы.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-325-330

### Введение

Чума – зоонозная природно-очаговая бактериальная особо опасная инфекционная болезнь с преимущественно трансмиссивным механизмом передачи возбудителя [1]. Заражение возбудителем чумы в природных очагах во время эпизоотий происходит в соответствии с классической схемой горизонтальной трансмиссии: «грызун–блоха–грызун». Однако до сих пор не установлен механизм сохранения возбудителя во время длительных межэпизоотических периодов, когда не выделяются культуры возбудителя и не выявляются зараженные грызуны. Некоторые стороны экологии *Yersinia pestis*, связанные не только с длительным сохранением, но и с другими путями переноса возбудителя в макроорганизм млекопитающих, остаются малоисследованными. Предложено несколько гипотез, объясняющих сохранение возбудителя в биоценозах природных очагов чумы, но ни одна из них не доказана экспериментально. Недавно была сформулирована гипотеза вертикальной трансмиссии, по которой чумной микроб способен сохраняться в почвенных биоценозах очагов чумы в простейших и нематодах [2–4].

На сегодняшний день в литературе встречаются данные о способности *Y. pestis* сохраняться в клетках амёб *Acanthamoeba* и *Dictyostelium* от 5 дней до нескольких месяцев, что доказывает возможность рассмотрения их в качестве природных резервуаров возбудителя чумы с учетом высокой численности простейших в почве нор грызунов [5–7]. Однако механизмы сохранения и локализация возбудителя чумы как члена почвенного биоценоза остаются малоисследованными. В связи с этим представляет интерес идентификация доминирующих видов простейших из природных очагов чумы. Это позволит



охарактеризовать состав почвенного биоценоза в очагах и конкретизировать некоторые положения гипотезы вертикальной трансмиссии.

В связи с вариабельностью морфологических признаков в зависимости от условий среды определение систематической принадлежности простейших вызывает затруднения, что может приводить к получению недостоверных данных. Наиболее надежным методом выявления родства организмов является сравнение их нуклеотидных последовательностей. Для определения видовой принадлежности эукариотических организмов используются участки рибосомальных генов, в частности, достаточно консервативный участок гена 18S рРНК и более вариабельные области – внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1, ITS2) [8].

В данной работе представлены результаты по определению систематической принадлежности амёб из почв Горного Алтая по нуклеотидным последовательностям рибосомальных генов. Также приводятся данные филогенетического анализа исследованных штаммов простейших по нуклеотидным последовательностям рибосомальных генов.

#### Материалы и методы

Работа проводилась с ДНК амёб, выделенных из нор серого сурка в наиболее типичных

биотопах Горно-Алтайского высокогорного очага, в которых были зарегистрированы случаи возникновения эпизоотий в 2014–2016 гг. Для анализа было выбрано 8 точек (с номерами 4, 5, 8, 9, 10, 13, 18, 20) с выраженной эпизоотической активностью, расположенных в разных участках очага. Пробы забирались на разной глубине от 10 до 120 см (10–20 см, 30–50 см, 100 см и 120 см) по методу конверта. Амёб получали из вытяжек почвы посевом на голодный агар [8]. Выделенные штаммы простейших получили обозначение по номерам точек, в которых они были собраны.

Для установления принадлежности к *Acanthamoeba* использовали праймеры JDP1/JDP2 на участок гена 18S рРНК: прямой праймер – 5'GCCCAGATCGTTTACCGTGAA, обратный праймер – 5'TCTCACAAGCTGCTAGG-GGAGTCA, температура отжига составляла 59°C [8]. Для работы с родом амёб *Dictyostelium* были рассчитаны специфичные праймеры на нуклеотидные последовательности на ITS регион и прилегающие участки с помощью онлайн-сервиса Primer3Plus и программы Ugene 1.28.1 на основе референсных последовательностей из международной базы данных NCBI. Последовательности праймеров и температуры отжига представлены в таблице. Синтез праймеров осуществляли в лаборатории диагностических препаратов РосНИПЧИ «Микроб».

Последовательности праймеров на ITS регион *Dictyostelium spp.*

№	Название	Последовательность 5'-3'	Температура плавления T <sub>m</sub> , °C
1	AR_D_F	TCCCTGCCCTTTGTACACAC	59,9
2	AR_D_R	TATTCCTCTTCACTCGCCG	59,9
3	AR_S	GCCACCATTTTGCCTCTTGAT	60
4	AR_As	CGTCTTCACTCGCCGTTACT	60,1
5	AR_D_S2	GTCCGGAAGGATTGGGTAAT	60
6	AR_D_As2	ATAAGCCTCATCCCCATTT	59,6

Специфичность рассчитанных праймеров была подтверждена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для рассчитанных пар праймеров были оптимизированы условия проведения ПЦР. При проведении ПЦР использовали набор БиомастерLRHS-ПЦР (ООО «Биолабмикс», г. Новосибирск). Секвенирование полученных в ПЦР фрагментов проводили на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3500xL» в лаборатории геномного и протеомного анализа РосНИПЧИ «Микроб». Анализ полученных нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью выравнивания на референсные последовательности алгоритмом BLAST NCBI

GenBANK. Филогенетический анализ проводили с применением программы Mega 7.0, Ugene 1.28.1 алгоритмами Maximum Likelihood. Визуализация филогенетических деревьев осуществлялась программами FigTree 1.4.3 и Dendroscope.

#### Результаты и их обсуждение

Из проб почв, собранных в разных участках Горно-Алтайского высокогорного очага, были выделены простейшие, которые по морфологическим характеристикам были отнесены к *Acanthamoeba* и *Dictyostelium*. К акантамебам были отнесены штаммы, выделенные в точках забора с номерами 10, 18, 20, и по этому признаку



штаммы акантамеб были обозначены как 10А, 18А и 20А. Аналогично из точек 4, 5, 8, 9, 10, 13 были выделены слизевики рода *Dictyostelium*. Выделенные штаммы были обозначены как 4D, D5, D8, 9D, 10D, D13. Для подтверждения систематической принадлежности выделенных штаммов амёб был проведен анализ их нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов.

Согласно литературным данным, для определения систематической принадлежности акантамеб используется участок гена 18S рРНК, нуклеотидные последовательности которого являются достаточно информативными и наиболее широко представлены в генетических базах данных. Поэтому для подтверждения принадлежности выделенных нами амёб к роду *Acanthamoeba* были использованы праймеры JDP1/JDP2 на участок гена 18S рРНК. Полученные методом ПЦР с помощью этих праймеров

нуклеотидные последовательности штаммов амёб 10А, 18А, 20А размером около 450 п.н. показали 100% гомологию с последовательностями *A. castellanii*, депонированными в базе данных GenBank. Это подтверждает сделанное нами на основе морфологического анализа предположение об их принадлежности к роду *Acanthamoeba*. Филогенетический анализ полученных образцов проводился с помощью программы Ugene 1.28.1 алгоритмом Maximum Likelihood. В соответствии с установленным процентом гомологии выделенные штаммы образуют общий кластер с *A. castellanii*, что соответствует идентичности анализируемого участка гена 18S рРНК. Полученные результаты доказывают, что исследованные штаммы, выделенные в части участков Горно-Алтайского высокогорного очага, относятся к виду *A. castellanii*. Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 1.

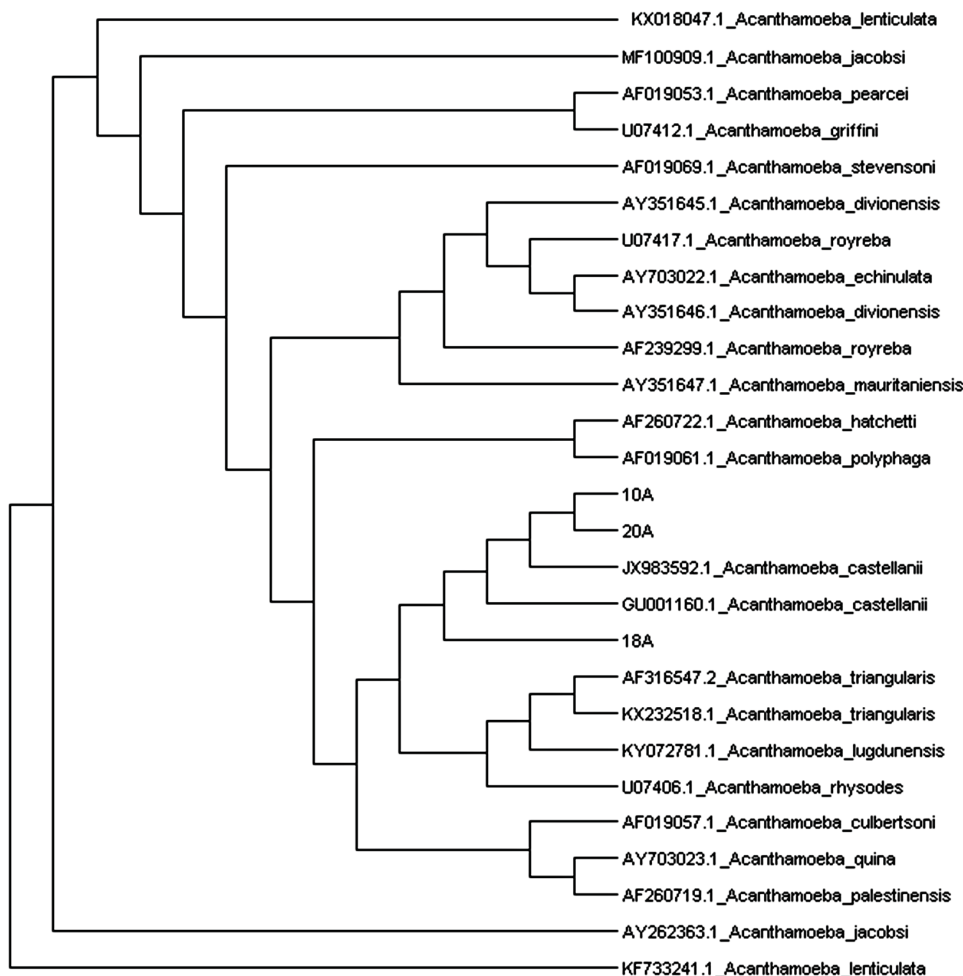


Рис. 1. Филогенетический анализ амёб рода *Acanthamoeba* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага по нуклеотидным последовательностям участка 18SpРНК (программа Ugene 1.28.1, алгоритм Maximum Likelihood). Вертикальной чертой отмечено положение исследованных штаммов амёб из Горного Алтая



Ранее была установлена систематическая принадлежность штаммов акантамеб из почв очагов Прикаспия [8]. Изолят из Волго-Уральского степного очага также относится к *A. castellanii*. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данный вид широко распространен в природных очагах чумы степной зоны России.

Для установления систематической принадлежности других выделенных штаммов амёб (4D, D5, D8, 9D, 10D, D13), которые по морфологическим признакам были идентифицированы как *Dictyostelium*, нами был взят протяженный участок рибосомальных генов (часть гена 17S, спейсер ITS1, участок 5.8S, спейсер ITS2, часть гена 26S рРНК). Анализируемый

участок содержал как вариабельные (ITS1, ITS2), так и высококонсервативные нуклеотидные последовательности. Нами были рассчитаны праймеры, позволяющие амплифицировать весь этот участок размером 1000–1200 п.н. (см. таблицу). При анализе данных фрагментарного секвенирования полученных ПЦР фрагментов была выявлена гомология с *D. sphaerocephalum* штаммов D8 и 10D (по 99%), с *D. mucoroides* – 4D, D5, D13 (по 99%), 9D (98%). На основании полученных данных был проведен филогенетический анализ с помощью программы Ugene 1.28.1, алгоритм Maximum Likelihood. Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 2. Из полученной дендрограммы следует,

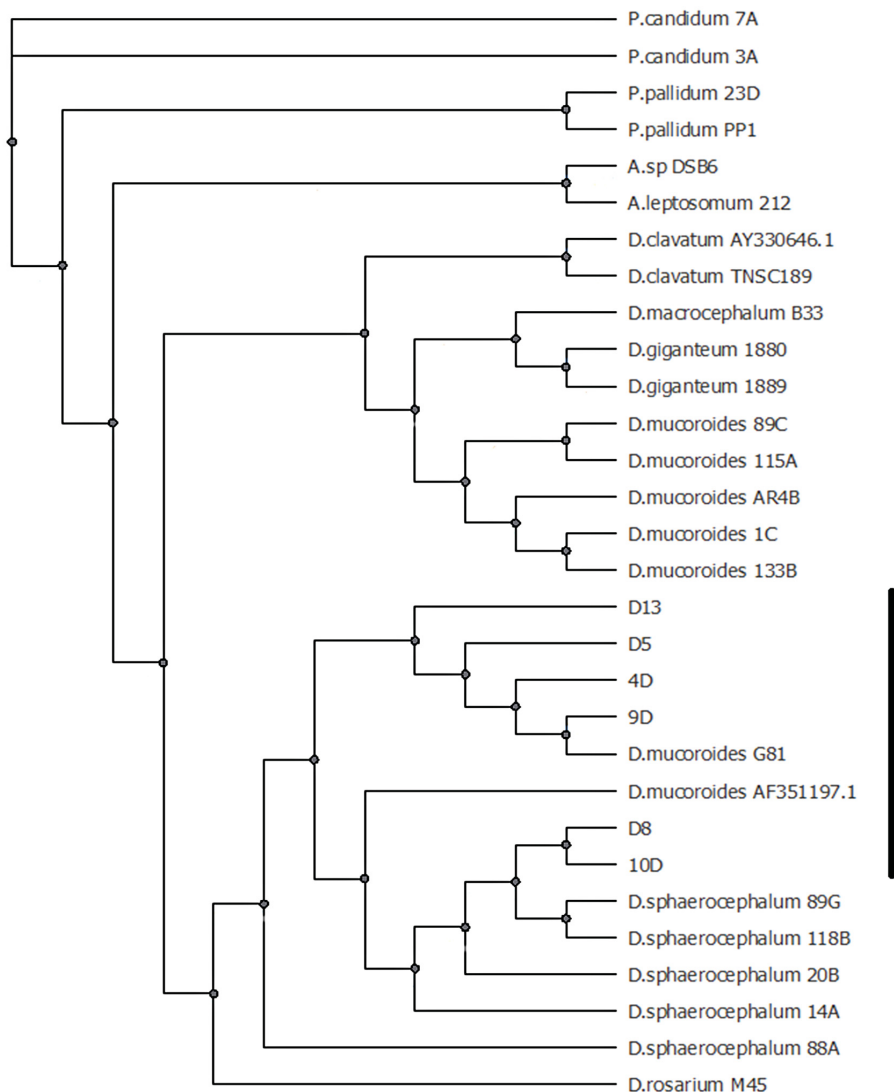


Рис. 2. Филогенетический анализ амёб рода *Dictyostelium* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага по нуклеотидным последовательностям участка рибосомальных генов, включающего фрагмент 17S – ITS1 – 5.8S – ITS2 – фрагмент 26S рРНК (программа Ugene 1.28.1, алгоритм Maximum Likelihood). Вертикальной чертой отмечено положение исследованных штаммов амёб из Горного Алтая



что анализируемые штаммы образуют большой общий кластер с другими представителями *Dictyostelium*. При этом каждый из них входит в один подкластер с тем видом, с которым наблюдается максимальный процент гомологии полученной нуклеотидной последовательности, включая виды *D. sphaerocephalum* и *D. mucoroides*. Таким образом, на основании процента гомологии и филогенетического родства установлено, что анализируемые штаммы *Dictyostelium* относятся к данным видам.

### Заключение

Таким образом, на основании анализа морфологических признаков и сравнения нуклеотидных последовательностей установлена принадлежность простейших, выделенных в разных эпизоотических участках Горно-Алтайского высокогорного очага, к родам *Acanthamoeba* и *Dictyostelium*, и уточнена их видовая принадлежность, включающая виды *A. castellanii*, *D. sphaerocephalum* и *D. mucoroides*. В целом определение систематической принадлежности выделенных штаммов простейших пополняет знания о доминантных членах почвенного биоценоза нор грызунов природных очагов чумы. Полученные данные в совокупности с публикациями отечественных и зарубежных исследователей подтверждают, что простейшие являются перспективной моделью для изучения механизмов сохранения и передачи возбудителя чумы. Выявление природных резервуаров возбудителя чумы в почвенных биоценозах в дальнейшем позволит оптимизировать комплекс профилактических мер, проводимых в природных очагах чумы.

### Список литературы

1. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири / под ред. Г. Г. Онищенко, В. В. Кутырева. М. : Медицина, 2004. 191 с.
2. Кутырев В. В., Ерошенко Г. А., Попов Н. В., Видяева Н. А., Коннов Н. П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2009. Вып. 4. С. 6–13.
3. Попов Н. В., Слудский А. А., Удовиков А. И., Анискин В. В., Яковлев С. А., Караваева Т. Б. К роли нематод [Secernentea, Rhabdidae] – паразитов блох в энзоотии чумы // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2006. Вып. 5. С. 88–93.
4. Попов Н. В., Слудский А. А., Удовиков А. И., Коннов Н. П., Караваева Т. Б., Храмов В. Н. Оценка роли биоплёнок *Yersinia pestis* в механизме энзоотии чумы // ЖМЭИ. 2008. Вып. 4. С. 118–120.
5. Кошель Е. И., Ерошенко Г. А., Анисимова Л. В., Новичкова Л. А., Широков А. А., Буров А. М., Кузнецов О. С., Кутырев В. В. Оценка длительности сохранения штаммов *Yersinia pestis* в клетках почвенных амёб *Acanthamoeba* sp., в экспериментальных условиях // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. Вып. 2. С. 69–74.
6. Benavides-Montaño J. A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* Resists Predation by *Acanthamoeba castellanii* and Exhibits Prolonged Intracellular Survival // Appl. Environ. Microbiol. 2017. Vol. 83, № 13. P. 1–15.
7. Markman D. W., Antolin M. F., Bowen R. A., Wheat W. H., Woods M., Gonzalez-Juarrero M., Jackson M. *Yersinia pestis* Survival and Replication in Potential Ameba Reservoir // Emerg Infect Dis. 2018. Vol. 24, № 2. P. 294–302.
8. Кошель Е. И., Анисимова Л. В., Новичкова Л. А., Видяева Н. А., Гусева Н. П., Ерошенко Г. А., Кутырев В. В. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона // Генетика. 2015. Вып. 51. С. 39–45.

### Analysis of the Systematic Appurtenance of Protozoa from the Soils of the Gorno-Altai High-mountain Plague Focus

M. A. Makashova, E. G. Oglodin, K. A. Nikiforov, N. A. Sharapova, G. A. Eroshenko

Marina A. Makashova, ORCID 0000-0002-7713-7959, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, makashova11@gmail.com

Evgeniy G. Oglodin, ORCID 0000-0002-2955-3034, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, e.oglodin@rambler.ru

Konstantin A. Nikiforov, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, nikiforov666666@mail.ru

Nataliya A. Sharapova, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, podbor\_nat@mail.ru

Galina A. Eroshenko, ORCID 0000-0001-5403-989X, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, geroshenko@yandex.ru

Characterization of the species composition of the dominant representatives of Protozoa in natural plague foci is important for the study of certain aspects of ecology and persistence mechanisms of *Yersinia pestis*. Determination of systematic belonging of amoebas isolated from the soils of the Gorno-Altai high-mountain plague focus in 2016 year was carried out by analyzing nucleotide sequences of ribosomal genes of these protozoans. The analyzed sequences of ribosomal genes were obtained by PCR with specific



primers followed by sequencing of PCR products. Analysis of the data of sequencing was performed by aligning the obtained nucleotide sequences to the reference nucleotide sequences of the protozoans from the NCBI GenBank database. Phylogenetic analysis was carried out using Mega 7.0, Ugene 1.28.1 with Maximum Likelihood algorithm. As a result, the systematic belonging of the protozoans, isolated from various epizootic plague sites of the Gorny Altai soils, to the species *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium sphaerocephalum* and *D. mucoroides* was established.

Together with data on the high number of isolated amoebas and the ability of *Yersinia pestis* to survive in the cells of these protozoans, the identified amoeba species can be considered as probable natural plague reservoirs. Isolated strains of amoebas can be used as a model organisms in studying of the ecology features and the persistence mechanisms of the plague agent in soil biocenosis of rodent's burrows of natural plague foci.

**Key words:** Protozoa, *Acanthamoeba*, *Dictyostelium*, soil biocenosis, Gorno-Altai high-mountain plague focus.

---

**Образец для цитирования:**

Макашова М. А., Оглодин Е. Г., Никифоров К. А., Шарпова Н. А., Ерошенко Г. А. Анализ систематической принадлежности простейших из почв горно-алтайского высокогорного очага чумы // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 325–330. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-325-330

**Cite this article as:**

Makashova M. A., Oglodin E. G., Nikiforov K. A., Sharapova N. A., Eroshenko G. A. Analysis of the Systematic Appurtenance of Protozoa from the Soils of the Gorno-Altai High-mountain Plague Focus. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 325–330 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-325-330

---





УДК 579.222.4

## ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАКОПЛЕНИЯ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА КЛЕТКАМИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ АММОНИЯ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ



В. В. Паршина, Ю. А. Дятлова, А. В. Тугарова

Паршина Виктория Валерьевна, студент кафедры биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, parshina-v-v@yandex.ru

Дятлова Юлия Анатольевна, аспирант лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, jdyatlova2013@yandex.ru

Тугарова Анна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, tugarova\_anna@mail.ru

Многие бактерии синтезируют в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды сложные полиэфиры класса полигидроксиалканоатов (ПГА). Эти биополимеры, накапливаясь внутри бактериальных клеток в виде гранул, позволяют бактериям лучше противостоять негативным внешним условиям и служат резервными источниками углерода и энергии. Ризосферные бактерии вида *Azospirillum brasilense* синтезируют лишь один из ПГА – поли-3-гидроксибутират (ПГБ) – в качестве ответной реакции на стрессовые факторы. Знание принципов и условий синтеза ПГБ важно как для понимания существования азоспирилл в естественной среде обитания, так и при использовании их в качестве биоудобрений – для сохранения их жизнеспособности. В настоящей работе с помощью метода инфракрасной (ИК) фурье-спектроскопии исследовано накопление ПГБ клетками штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 при выращивании бактерий в течение 6 сут. на синтетической малатно-солевой питательной среде с добавлением различных концентраций хлорида аммония (0.05, 0.10 и 0.21 г/л). Сравнительный анализ ИК-фурье-спектров образцов полученных биомасс бактерий показал, что при субоптимальных исходных концентрациях связанного азота в среде накопление ПГБ штаммом *A. brasilense* Sp7 в течение 1–6 сут. культивирования происходит более интенсивно, чем штаммом Sp245. При этом наибольшее относительное количество ПГБ в биомассе накапливалось штаммом *A. brasilense* Sp7 при исходной концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в среде 0.10 г/л после 3 сут. культивирования.

**Ключевые слова:** *Azospirillum*, поли-3-гидроксибутират, ИК-фурье-спектроскопия.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-331-335

### Введение

Многие микроорганизмы способны к синтезу сложных полиэфиров класса полигидроксиалканоатов (ПГА). Данные биополимеры синтезируются бактериями в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды, такие как дефицит

питательных веществ, присутствие соединений тяжелых металлов и др. Как известно, ПГА накапливаются внутри бактериальных клеток в виде гранул и позволяют бактериям лучше противостоять негативным внешним условиям, а также являются резервными источниками углерода и энергии [1]. С другой стороны, биополимеры класса ПГА являются экологически безопасной альтернативой традиционным пластикам: они быстро разрушаются в окружающей среде и по своим физическим свойствам сходны с синтетическими пластиками. Одним из самых простых полиэфиров класса ПГА является поли-3-гидроксибутират (ПГБ), наиболее изученный биопластик из класса ПГА микробного происхождения, состоящий из мономеров  $\beta$ -оксимасляной кислоты.

Бактерии *Azospirillum brasilense*, обитающие в ризосфере растений и способные образовывать ассоциации с корнями многих растений [2], синтезируют ПГБ в качестве ответной реакции на стрессовые факторы [3–6]. Эти ризобактерии также используются в составе биоудобрений для улучшения роста и урожайности растений [7, 8].

Знание принципов и условий синтеза ПГБ важно как для понимания существования азоспирилл в естественной среде обитания, так и при использовании их в качестве биоудобрений – для сохранения их жизнеспособности.

Целью данной работы был подбор условий культивирования для бактерий *A. brasilense* для получения максимального количества ПГБ при минимальном времени роста культуры. Для работы были выбраны одни из наиболее изученных штаммов *A. brasilense*: Sp7 и Sp245, отличающиеся занимаемыми ими экологическими нишами в ризосфере и поведением в сходных условиях [3, 4, 6]. Штамм *A. brasilense* Sp245 является эндофитом, способным к внутриклеточной/внутрикорневой колонизации, в то время как Sp7 может колонизировать корни растений только поверхностно.

В качестве аналитического метода использована инфракрасная (ИК) фурье-спектроскопия, позволяющая получить ценную структурную информацию и одновременно проводить монито-



ринг относительного содержания отдельных макрокомпонентов сложных биологических систем, включая бактериальную биомассу [3–6, 9–13].

### Материалы и методы

В работе были использованы штаммы *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145) [14] и Sp245 [15], полученные из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WDCM 1021). Бактерии выращивали на синтетической малатной среде (СМС, pH 6.8), предложенной Дей и Доберейнер [16]. Железо в среду вносили в хелатной форме ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2.0 г/л; нитрилотриуксусная кислота – 5.6 г/л) из расчета 10 мл раствора на литр среды перед автоклавированием. Соли  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CaCl}_2$  были приготовлены в виде стоковых 100-кратных стерильных растворов, которые добавляли в среду культивирования после автоклавирования последней. Среду стерилизовали в течение 30 мин при 121°C.

Посевной материал выращивали при 28–31°C аэробно в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих по 100 мл СМС, в течение 18–22 ч до оптической плотности 0.9–1.1. Инокулят вносили из расчета 1 мл на 100 мл среды. Контроль чистоты культуры осуществлялся методом «раздавленной капли» на микроскопе «Olympus» (модель C011, Япония) при увеличении в 400 раз. Плотность культуры определяли с помощью спектрофотометра (Specol 221;  $\lambda = 600$  нм).

Для мониторинга синтеза ПГБ бактерии штаммов *A. brasilense* Sp245 и Sp7 выращивали на среде СМС с добавлением 0.05, 0.10 и 0.21 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Культуры растили в аэробных условиях при температуре 31°C в течение 6 сут. Мониторинг синтеза ПГБ осуществлялся методом ИК-фурье-спектроскопии *in situ* (без выделения ПГБ из биомассы). После 1, 2, 3 и 6 сут. в стерильных условиях отбиралось по 10 мл культуры. Отобранные образцы центрифугировали (10000g, 7 мин), трижды отмывали физиологическим раствором (8.5 г NaCl на 1 л дистиллированной воды), осадок клеток высушивали в сушильном шкафу при 40–50°C, тщательно растирали в агатовой ступке и ресуспендировали в 150–200 мкл воды (MilliQ). Полученную суспензию наносили на подложку из специального стекла (ZnSe, прозрачного в ИК-области) и высушивали при 45°C. ИК-спектры образцов культур измеряли на ИК-фурье-спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation, США) в режиме пропускания (transmission) в диапазоне 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  с накоплением 64 разверток спектров (разрешение 4  $\text{cm}^{-1}$ ) при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Обработку спектров проводи-

ли с помощью стандартной программы OMNIC, поставляемой вместе со спектрометром.

Расчет относительного количества синтезированного ПГБ ( $\alpha$ ) проводили, используя формулу [9]

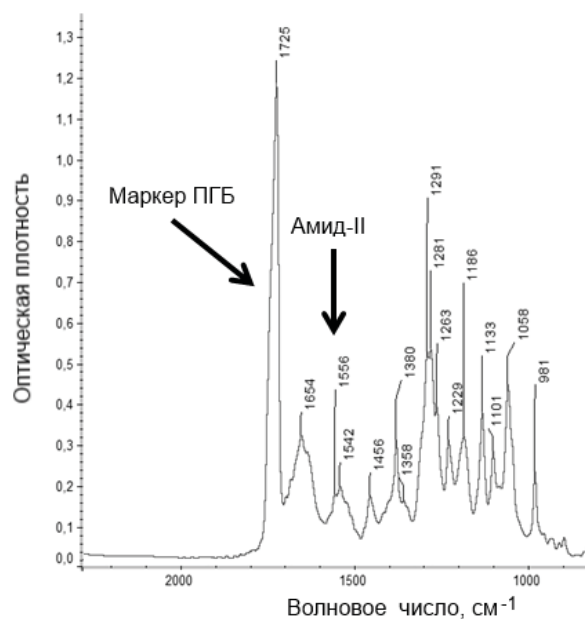
$$\alpha = I_{\nu(\text{C}=\text{O})} / I_{\text{амид-II}}, \quad (1)$$

где  $I_{\nu(\text{C}=\text{O})}$  – интенсивность полосы валентных колебаний карбонильной группы (C=O) в ПГБ (~1730)  $\text{cm}^{-1}$  как маркера содержания ПГБ;  $I_{\text{амид-II}}$  – интенсивность полосы амид-II (соответствующей клеточным белкам; ~1550  $\text{cm}^{-1}$ ).

### Результаты и их обсуждение

В работе для оценки относительного содержания ПГБ в бактериальной биомассе был использован метод ИК-фурье-спектроскопии. В отличие от других методов, применяемых для определения ПГБ (например, ВЭЖХ), он требует минимальных затрат (без сложных процедур пробоподготовки) и минимальных количеств образца. В основе метода ИК-фурье-спектроскопии лежит регистрация колебательных переходов функциональных групп (групп атомов в молекулах, связанных химическими связями) под действием ИК-излучения, вызывающих изменение дипольного момента функциональных групп в молекулах вещества. ИК-спектры микробных клеток являются специфичными и отражают наличие всех типов биологических молекул в образце.

На рисунке представлен спектр бактериальной культуры *A. brasilense* Sp7, выращенной в течение 3 сут. в присутствии 0.10 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .



ИК-фурье-спектр высушенной биомассы штамма *A. brasilense* Sp7, выращенного в течение 3 сут. в присутствии 0.10 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . ПГБ – поли-3-гидроксибутират



Накопление ПГА в биомассе определяют по характерным для этих полиэфиров полосам, в первую очередь по наиболее интенсивной полосе валентных колебаний карбонильной группы сложноэфирного фрагмента (в области 1720–1750  $\text{см}^{-1}$ ). Данная полоса использовалась нами в работе как маркер ПГБ. Известно, что в бактериальной клетке содержание белка составляет порядка 40–60% и для определенных бактерий в сходных условиях изменяется несущественно

[17], что в ИК-спектроскопии позволяет использовать интенсивности характеристических полос клеточных белков амид-I (в области 1620–1680  $\text{см}^{-1}$ ) или амид-II (около 1550  $\text{см}^{-1}$ ) как внутренний стандарт [9, 17]. На основании анализа спектров рассчитывалось отношение интенсивности полосы – маркера ПГБ к интенсивности полосы амид-II по описанной выше методике [9]. В таблице представлены рассчитанные соотношения ( $\alpha$ ) для измеренных спектров исследуемых образцов.

**Соотношение интенсивностей ( $\alpha$ ; см. формулу (1) полос ПГБ (около 1730  $\text{см}^{-1}$ ) и амид-II (около 1550  $\text{см}^{-1}$ ) в ИК-фурье-спектрах биомассы бактерий при накоплении поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) штаммами *A. brasilense* Sp7 и Sp245**

Время, сут.	Концентрация $\text{NH}_4\text{Cl}$ в среде выращивания, г/л					
	0.05		0.10		0.21	
	Sp7	Sp245	Sp7	Sp245	Sp7	Sp245
1	4.94	0.59	3.09	0.46	2.07	0.33
2	4.59	0.94	7.05	0.61	4.99	0.57
3	4.7	0.96	8.46	1.06	4.39	0.97
6	2.62	1.02	5.08	0.4	2.94	0.66

Как видно из представленных данных, величины  $\alpha$  для штамма *A. brasilense* Sp245 во всех случаях значительно (в ~2.5–8 раз) ниже, чем для штамма Sp7. Это отражает существенно меньшее накопление ПГБ штаммом Sp245 в аналогичных условиях и, вероятно, связано с более выраженным клеточным ответом штамма Sp7 на неблагоприятные условия (в присутствии малых концентраций связанного азота в среде) [3]. Значение  $\alpha$  максимально для штамма *A. brasilense* Sp7 при выращивании в течение 3 сут. при исходном содержании  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.10 г/л. Снижение величины  $\alpha$ , отражающее снижение относительного содержания ПГБ, отчетливо проявляющееся на 6-е сут. культивирования, соответствует переходу бактерий на использование внутренних резервов (ПГБ) при исчерпании питательных веществ среды. Однако необходимо отметить, что форма полосы валентных колебаний карбонильной группы сложноэфирного фрагмента в области 1720–1750  $\text{см}^{-1}$  для измеренных нами спектров заметно отличалась для разных образцов, что отражает различное соотношение упорядоченной (с большей степенью кристалличности) и неупорядоченной (более аморфной) структур ПГБ, имеющих различающиеся частоты колебаний [18]. Данное обстоятельство может снижать точность определения относительного содержания ПГБ по используемому в данной работе методу расчета соотношения  $\alpha$  (по отношению интенсивностей полос). Тем не менее сравнение значений  $\alpha$  для

биомасс, выращенных и изученных в сходных условиях, позволяет оценить различия в уровне накопления ПГБ клетками бактерий.

Таким образом, на основании проведенных экспериментальных исследований и расчетов показано, что при субоптимальных исходных концентрациях связанного азота в среде (0.05–0.21 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) накопление ПГБ штаммом *A. brasilense* Sp7 в течение 1–6 сут. культивирования происходит более интенсивно, чем штаммом Sp245. Максимальное количество ПГБ накапливается штаммом *A. brasilense* Sp7 при исходной концентрации хлорида аммония в среде 0.10 г/л после 3 сут культивирования.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору, доктору химических наук А. А. Камневу, ведущему научному сотруднику лаборатории биохимии ИБФРМ РАН (Саратов), за помощь в интерпретации и описании полученных результатов. Представленные ИК-фурье-спектроскопические исследования проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-08-01696-а).

#### Список литературы

1. Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y., Castro-Sowinski S. Ecological and agricultural significance of



- bacterial polyhydroxyalkanoates // Crit. Rev. Microbiol. 2005. Vol. 31. P. 55–67.
2. *Bashan Y., de-Bashan L. E.* How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment // Adv. Agron. 2010. Vol. 108. P. 77–136.
  3. *Kamnev A. A., Tugarova A. V., Antonyuk L. P., Tarantilis P. A., Kulikov L. A., Perfliev Yu. D., Polissiou M. G., Gardiner P. H. E.* Instrumental analysis of bacterial cells using vibrational and emission Mössbauer spectroscopic techniques // Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 573–574. P. 445–452.
  4. *Kamnev A. A.* FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling // Spectrosc. Intern. J. 2008. Vol. 22, № 2–3. P. 83–95.
  5. *Kamnev A. A., Sadovnikova J. N., Tarantilis P. A., Polissiou M. G., Antonyuk L. P.* Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin : a diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopic study // Microb. Ecol. 2008. Vol. 56, № 4. P. 615–624.
  6. *Kamnev A. A., Tugarova A. V., Tarantilis P. A., Gardiner P. H. E., Polissiou M. G.* Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 : the effects of copper(II) // Appl. Soil Ecol. 2012. Vol. 61. P. 213–216.
  7. *Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y.* Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2011. Vol. 326, № 2. P. 99–108.
  8. *Cassán F., Diaz-Zorita M.* *Azospirillum* sp. in current agriculture : From the laboratory to the field // Soil Biol. Biochem. 2016. Vol. 103. P. 117–130.
  9. *Naumann D.* Infrared Spectroscopy in Microbiology // Encyclopedia of Analytical Chemistry / ed. R. A. Meyers. Chichester : Wiley, 2000. P. 102–131.
  10. *Kamnev A. A., Mamchenkova P. V., Dyatlova Yu. A., Tugarova A. V.* FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles // J. Mol. Struct. 2017. Vol. 1140. P. 106–112.
  11. *Tugarova A. V., Shelud'ko A. V., Dyatlova Yu. A., Filip'echeva Yu. A., Kamnev A. A.* FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 // J. Mol. Struct. 2017. Vol. 1140. P. 142–147.
  12. *Tugarova A. V., Mamchenkova P. V., Dyatlova Yu. A., Kamnev A. A.* FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thophilum* // Spectrochim. Acta Part A : Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. Vol. 192. P. 458–463.
  13. *Kamnev A. A., Tugarova A. V., Dyatlova Yu. A., Tarantilis P. A., Grigoryeva O. P., Fainleib A. M., De Luca S.* Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy : Implications for structural analyses of biomacromolecular samples // Spectrochim. Acta Part A : Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. Vol. 193. P. 558–564.
  14. *Tarrand J. J., Krieg N. R., Döbereiner J.* A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov // Can. J. Microbiol. 1978. Vol. 24, № 8. P. 967–980.
  15. *Baldani V. L. D., Baldani J. I., Döbereiner J.* Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29, № 8. P. 924–929.
  16. *Day J. M., Döbereiner J.* Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots // Soil Biol. Biochem. 1976. Vol. 8, № 1. P. 45–50.
  17. *Kansiz M., Billman-Jacobe H., McNaughton D.* Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66, № 8. P. 3415–3420.
  18. *Kansiz M., Dominguez-Vidal A., McNaughton D., Lendl B.* Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) // Anal. Bioanal. Chem. 2007. Vol. 388, № 5–6. P. 1207–1213.
- Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Poly-3-Hydroxybutyrate Accumulation by *Azospirillum brasilense* Cells at Various Cultivation Periods and Ammonium Concentrations in the Culture Medium**
- V. V. Parshina, Yu. A. Dyatlova, A. V. Tugarova**
- Victoria V. Parshina, ORCID 0000-0003-1885-9422, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, parshina-v-v@yandex.ru
- Yulia A. Dyatlova, ORCID 0000-0002-8451-7271, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049, Russia, jdyatlova2013@yandex.ru
- Anna V. Tugarova, ORCID 0000-0001-6017-4289, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049, Russia, tugarova\_anna@mail.ru
- Many bacteria, in response to unfavourable environmental conditions, can synthesise polyesters of the polyhydroxyalkanoate (PHA) class. These biopolymers, accumulating intracellularly in the form of granules, help the bacteria to cope with negative environments and are utilised as reserve sources of carbon and energy. Rhizobacteria of the species *Azospirillum brasilense* synthesise a single type of PHA, poly-3-hydroxybutyrate (PHB), in response to stress factors. Knowledge of the principles and conditions of PHB synthesis is of importance both for understanding the subsistence of azospirilla in their natural habitats and for their use



as biofertilisers, to preserve their viability. In this work, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to study PHB accumulation by cells of *Azospirillum brasilense* strains Sp7 и Sp245 during growth of the bacteria for 6 days in standard malate salt medium containing various concentrations of ammonium chloride (0.05, 0.10 and 0.21 g/l). Comparative analysis of FTIR spectra of the bacterial biomass samples showed that, at suboptimal initial concentrations of bound nitrogen in the medium, PHB accumulation after 1 to 6 days of cultivation was more intensive in *A. brasilense* strain Sp7 than in strain Sp245. Maximum relative amounts of PHB were accumulated by biomass of *A. brasilense* Sp7 grown for 3 days at the initial  $\text{NH}_4\text{Cl}$  concentration in the culture medium 0.10 g/l.

**Key words:** *Azospirillum*, poly-3-hydroxybutyrate, Fourier transform infrared spectroscopy.

**Acknowledgments:** *The authors are grateful to Professor A. A. Kamnev, D.Sc., Leading Researcher at the Laboratory of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS, Saratov, Russia), for his help in interpreting the experimental spectroscopic data. The experiments using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy were performed on the equipment of the "Simbioz" Centre for the Collective Use of Research Equipment in the field of physical-chemical biology and nanobiotechnology at IBPPM RAS, Saratov, Russia (FTIR spectrometer Nicolet 6700). This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 17-08-01696-a).*

**Образец для цитирования:**

Паршина В. В., Дятлова Ю. А., Тугарова А. В. ИК-Фурье-спектроскопический анализ накопления поли-3-гидроксибутирата клетками *Azospirillum brasilense* при различной продолжительности культивирования и концентрации аммония в питательной среде // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 331–335. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-331-335

**Cite this article as:**

Parshina V. V., Dyatlova Yu. A., Tugarova A. V. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Poly-3-Hydroxybutyrate Accumulation by *Azospirillum brasilense* Cells at Various Cultivation Periods and Ammonium Concentrations in the Culture Medium. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 331–335 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-331-335



УДК 595.76:574.38

## ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ЭКОЛОГО-ФАУНИСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ О МИЦЕТОФИЛЬНЫХ ЖЕСТКОКРЫЛЫХ (INSECTA: COLEOPTERA) САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ



А. С. Сажнев, А. А. Миронова, В. В. Аникин

Сажнев Алексей Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии водных беспозвоночных, Институт биологии внутренних вод имени И. Д. Папанина, п. Борок, Ярославская область, sazh@list.ru

Миронова Анастасия Алексеевна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, maa9898@mail.ru

Аникин Василий Викторович, доктор биологических наук, профессор кафедры морфологии и экологии животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, anikinvasiliiv@mail.ru

Для настоящего сообщения в Саратовской области специальных исследований фауны мицетофильных жесткокрылых не проводилось. Коллекционные сборы были проведены авторами в весенне-летний период 2017 г. с плодовых тел разных видов ксилотрофных базидиомицетов из семейств Fomitopsidaceae и Polypogonaceae на территории 4 районов Саратовской области (Воскресенский, Хвалынский, Саратовский, Энгельский). В результате на 4 видах ксилотрофных грибов было обнаружено 13 видов жесткокрылых из 6 семейств. На двух видах грибов доминировал вид *Dacne bipustulata*, его доля на *Fomitopsis pinicola* составила 87%, а на *Polyporus squamosus* – 65%. Наиболее заселенными оказались плодовые тела *Polyporus squamosus* как на уровне разнообразия видов, так и по общему количеству собранных жесткокрылых, наименее – *Fomes fomentarius*. Из числа установленных жесткокрылых преобладали облигатные мицетофаги, среди которых доминировали мицетосапрофаги – чернотелки *Neomidia haemorrhoidalis* (Fabricius, 1787) и *Pentaphyllus chrysomeloides* (Rossi, 1792). Самой малочисленной была группа специализированных хищников (охотятся на обитателей грибов), которая была представлена видом *Corticeus (Corticeus) bicolor* (Olivier, 1790).

**Ключевые слова:** фауна, жуки, грибы, базидиомицеты, Саратовская область.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-336-340

### Введение

Мицетофильные жесткокрылые, связанные с грибами трофически и консортивно, являются неотъемлемым компонентом лесных биоценозов. Разнообразие мицетофагов и мицетофилов в разных филогенетических ветвях отряда Coleoptera (около 60 таксонов на уровне семейств) говорит о неоспоримой значимости грибов в эволюции жесткокрылых насекомых [1, 2]. Мицетофаги

играют важную роль в цепи редуцентов лесных экосистем, а их высокая чувствительность к антропогенному влиянию на леса может быть применима в качестве индикатора состояния биоразнообразия лесных биоценозов [3]. Надо отметить, что трофические связи в системе «гриб–насекомое» (микознтомокомплексах) изучены фрагментарно, и, возможно, оценки количества мицетофагов и миксомицетофагов среди жуков занижены – для России на данный момент это порядка 10% от известной фауны жесткокрылых [2].

Крупнейшей сводкой по мицетофильным насекомым Палеарктики до сих пор остается работа Л. Беника [4], посвященная жукам, зарегистрированным в грибах и слизевиках. Российская наука в плане изучения мицетофильных насекомых отстает от зарубежных коллег и находится в большей степени на уровне накопления данных по фауне и биологии мицетобионтов. В ряде публикаций прошлого века содержатся сведения о жесткокрылых – обитателях сапротрофных, микоризообразующих [5–7] и ксилотрофных грибов [8–10]. Из современных работ можно выделить отдельные статьи и книги по жесткокрылым-мицетобионтам европейской части России [11–15], а также итоги изучения мицетофильных жуков Западной Сибири [16], Урала и Зауралья [17–21]. Наиболее значимыми сводками по экологии мицетофильных жуков остаются двухтомная монография Б. В. Красуцкого [1, 2] и диссертационное исследование по обитателям трутовых грибов европейской части России Д. С. Щигеля [3].

Для Саратовской области специальных исследований фауны мицетофильных жесткокрылых не проводилось. Данные по отдельным видам фрагментарны и находятся в разрозненном виде в отдельных фаунистических статьях [22–26].

### Материалы и методы

Сборы жесткокрылых насекомых проводили в весенне-летний период 2017 г. с плодовых тел разных видов ксилотрофных базидиомицетов из семейств Fomitopsidaceae и Polypogonaceae на территории четырех районов Саратовской области:

**Воскресенский р-н:** база СГУ «Чардым», на *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Gill., 8.06.2017;



**Саратов:** ул. Астраханская, на *Polyporus squamosus* (Huds.), 9.08.2017; там же, на *Laetiporus sulphureus* (Bull.), 9.08.2017, 16.09.2017, 18.09.2017 и 1.10.2017; там же, на *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Gill., 18.09.2017; парк «Липки», 13.09.2017; **Хвалынский р-н:** база СГУ, на *Polyporus squamosus* (Huds.), 7.07.2017; там же, на *Fomitopsis pinicola* (Fr.), 9.07.2017; **Энгельс:** ул. Берег Волги, на *Polyporus squamosus* (Huds.), 25.05.2017.

При отборе материала использовали ручной метод с использованием пинцета, стряхивание поверхностных обитателей плодовых тел базидиомицетов в энтомологический сачок, отдельные плодовые тела отделялись от субстрата, помещались в пронумерованный пакет, доставлялись в стационар, где проводился учет скрытноживущих видов. Имаго и личинок фиксировали в этиловом спирте, часть имаго монтировали на энтомологические булавки или помещали на ватные матрасики. Отобрано 13 проб, собрано 103 экз. жесткокрылых. Список основан на определениях имаго, так как детерминация личинок до вида часто невозможна – ключи для большинства видов не разработаны, а личинки не описаны.

Определение грибов проводили по современной литературе [27, 28]. Проверка определения базидиомицетов осуществлена доцентом кафедры ботаники и экологии Саратовского государствен-

ного университета О. В. Костецким, за что авторы выражают ему искреннюю благодарность.

В статье использованы фотографии плодовых тел грибов, сделанные А. А. Мироновой на цифровой однообъективный зеркальный фотоаппарат Nikon d5100.

### Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований на 4 видах ксилотрофных грибов (рис. 1) обнаружено 13 видов жесткокрылых из 6 семейств. Представленность видов мицетофильных жесткокрылых на заселяемых ими грибах показана в таблице.

В качестве дополнительного материала к фауне мицетофильных жуков Саратовской области приводим находки А. С. Сажнева: *Triplax (Platichna) lepida* (Falderman, 1835) на *Lentinus tigrinus*, *Triplax (Triplax) russica* (Linnaeus, 1758) на *Psathyrella* sp. и *Bolitophagus reticulatus* (Linnaeus, 1767) – на *Fomes fomentarius*.

Надо отметить, что в сборах практически не представлены Staphylinidae, такие как *Gyrophæna*, *Atheta* и др., отсутствуют виды семейства Ciidae, характерные для трутовиков. Вероятно, стоит изменить методику сбора на применение флотации и разнотипных эклекторов и ловушек [29], а также провести сбор материала в разные сроки с учетом состояния плодовых тел самих ксилотрофных грибов, так как известно,



Рис. 1. Плодовые тела исследованных видов ксилотрофных грибов: 1 – *Fomes fomentarius*, 2 – *Polyporus squamosus*, 3 – *Fomitopsis pinicola*, 4 – *Laetiporus sulphureus*



## Распределение мицетофильных жесткокрылых по заселяемым ими видам грибов

Вид жука	Вид гриба			
	<i>Fomes fomentarius</i>	<i>Fomitopsis pinicola</i>	<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>Polyporus squamosus</i>
<i>Bitoma crenata</i>	+	–	–	–
<i>Corticeus bicolor</i>	–	–	+	–
<i>Cryptophagus denticulatus</i>	–	–	–	+
<i>Dacne bipustulata</i>	+	+	–	+
<i>D. pontica</i>	+	–	–	–
<i>Diaperis boleti</i>	–	–	+	+
<i>Eledona agricola</i>	–	–	+	–
<i>Gyrophana strictula</i>	–	–	–	+
<i>Mycetophagus piceus</i>	–	–	–	+
<i>M. quadripustulatus</i>	+	–	–	+
<i>Neomidia haemorrhoidalis</i>	+	–	–	–
<i>Pentaphyllus chrysoloides</i>	–	+	–	+
<i>Scaphisoma agaricinum</i>	–	–	+	–

что разные группы жуков имеют предпочтения к разной степени зрелости и деструкции плодовых тел [2].

На двух видах грибов доминировал вид *Dacne bipustulata*, его доля на *Fomitopsis pinicola* составила 87%, а на *Polyporus squamosus* – 65%. Однако общности фауны жесткокрылых между

заселяемыми ими видами грибов не наблюдается, вероятно, из-за недостаточной выборки.

Наиболее заселенными оказались плодовые тела *Polyporus squamosus* как на уровне разнообразия видов, так и по общему количеству собранных жесткокрылых (рис. 2), наименее – *Fomes fomentarius*.

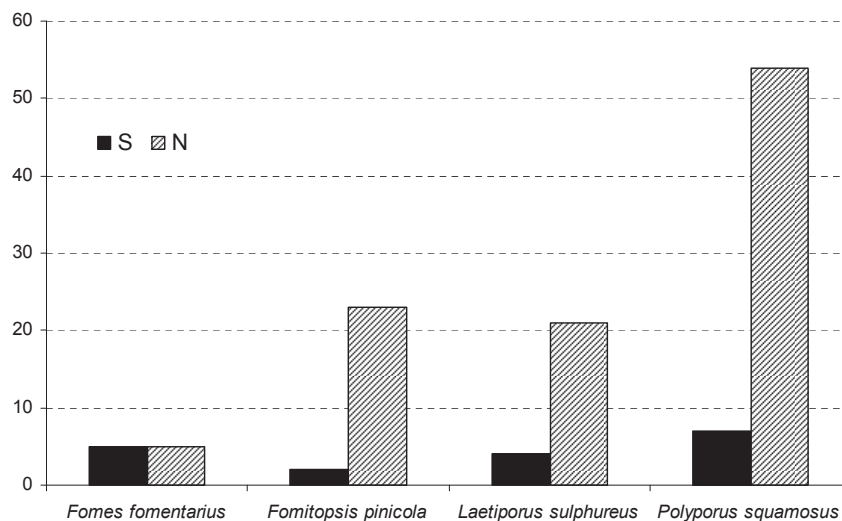


Рис. 2. Показатели заселенности плодовых тел жесткокрылыми

Для первичной оценки мицетофильного сообщества необходимо дать характеристику экологических функций отдельных видов и группировок насекомых, входящих в его состав, что можно проследить на примере трофических связей.

Так, среди зарегистрированных нами жесткокрылых можно выделить следующие группы: *облигатные мицетофаги* – виды, питающиеся исключительно грибами независимо от того, в какой среде они обитают, – подавляющее большинство в наших сборах. *Мицетосанпрофаги* – виды, раз-





вивающиеся в мертвых тканях грибов (плодовых тел) – чернотелки *Neomidia haemorrhoidalis* (Fabricius, 1787) и *Pentaphyllus chrysomeloides* (Rossi, 1792). А также *специализированные хищники* – охотятся на обитателей грибов – *Corticeus* (*Corticeus*) *bicolor* (Olivier, 1790).

### Список литературы

1. Красуцкий Б. В. Мицетофильные жесткокрылые Урала и Зауралья (Краткое иллюстрированное руководство к определению по имаго наиболее обычных в энтомокомплексах дереворазрушающих базидиальных грибов видов жесткокрылых). Екатеринбург : Изд-во «Екатеринбург», 1996. 146 с.
2. Красуцкий Б. В. Мицетофильные жесткокрылые Урала и Зауралья. Система «Грибы–насекомые» : в 2 т. Челябинск : ОАО «Челябинский дом печати», 2005. Т. 2. 213 с.
3. Щигель Д. С. Жесткокрылые – обитатели трутовых грибов Европейской части России : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2003. 21 с.
4. Benick L. Pilzkafer und Kaferpilz. Okologishe und statistische Untersuchungen // Acta zool. Fenn. 1952. Vol. 70. 250 s.
5. Бабенко А. С., Богатырева Л. А. Стафилиныды (Coleoptera, Staphylinidae) – обитатели шляпочных грибов в подтаежной зоне Западной Сибири // Вопр. общей энтомологии. 1981. Вып. 63. С. 64–65.
6. Халидов А. Б. Насекомые – разрушители грибов. Казань : Изд-во Казан. ун-та, 1984. 151 с.
7. Яковлев Е. Б., Осипова Л. Т. Видовой состав и биоэкологические особенности насекомых – обитателей плодовых тел съедобных грибов в Южной Карелии // Насекомые и фитопатогенные грибы в лесных экосистемах. Петрозаводск : Изд-во Карел. фил. АН СССР, 1985. С. 4–71.
8. Компанцев А. В. Комплексы жесткокрылых, связанные с основными дереворазрушающими грибами в лесах Костромской области // Животный мир Южной тайги. М. : Наука, 1984. С. 191–196.
9. Компанцев А. В. Трофические связи жесткокрылых-мицетофагов – обитателей плодовых тел базидиальных грибов // Изучение грибов в биогеоценозах : тез. докл. IV Всесоюз. конф. Свердловск : УрО АН СССР, 1988. С. 47.
10. Компанцева Т. В. Экологические особенности ксилофильных и мицетофильных жуков-чернотелок (Coleoptera, Tenebrionidae) // Экология и морфология насекомых – обитателей грибных субстратов. М. : Наука, 1987. С. 45–56.
11. Никитский Н. Б. Жуки-грибоеды (Coleoptera, Muscatorhagidae) фауны России и сопредельных стран. М. : Изд-во МГУ, 1993. 184 с.
12. Никитский Н. Б., Осипов И. Н., Чемерис М. В., Семенов В. Б., Гусаков А. А. Жесткокрылые-ксилобионты, мицетобионты и пластинчатоусые Приокско-Террасного Биосферного заповедника (с обзором фауны этих групп Московской области). М. : Изд-во МГУ, 1996. 198 с.
13. Никитский Н. Б., Семенов В. Б., Долгин М. М. Жесткокрылые – ксилобионты, мицетобионты и пластинчатоусые Приокско-Террасного биосферного заповедника (с обзором фауны этих групп Московской области). – Дополнение 1 (с замечаниями по номенклатуре и систематике некоторых жуков Melandryidae мировой фауны). М. : Изд-во МГУ, 1998. 62 с.
14. Schigel D. S., Niemela T., Simila T., Kinnunen J., Manninen O. Polypores and associated beetles of the North Karelian Biosphere Reserve, eastern Finland // Karstenia. 2004. Vol. 44. P. 35–56.
15. Сажнев А. С. Материалы к фауне мицетофильных жесткокрылых (Insecta, Coleoptera) окрестностей поселка Борок Ярославской области // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов : ООО «Амирит», 2016. Вып. 13. С. 35–38.
16. Красуцкий Б. В. Жесткокрылые-мицетобионты дереворазрушающих базидиальных грибов в подтаежных лесах Западной Сибири // Энтомологическое обозрение. 1995. Т. 74, вып. 3. С. 542–550.
17. Красуцкий Б. В. Жесткокрылые-мицетобионты (Coleoptera) основных дереворазрушающих грибов лесостепного Зауралья // Энтомологическое обозрение. 1996. Т. 75, вып. 2. С. 274–277.
18. Красуцкий Б. В. Жесткокрылые (Coleoptera, Insecta), связанные с настоящим трутовиком *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. (Basidiomycetes, Aphyllophorales) в лесах Урала и Зауралья // Проблемы биомониторинга естественных ландшафтов на Урале и в Северном Казахстане. Кустанай : КГУ, 1997. С. 27–55.
19. Красуцкий Б. В. Жесткокрылые (Coleoptera, Insecta) в мицетофильных сообществах дереворазрушающих грибов (Basidiomycetes, Fungi) лесостепного Зауралья // Беспозвоночные животные Южного Зауралья и сопредельных территорий. Курган, 1998. С. 205–208.
20. Красуцкий Б. В. Ксилофильные и мицетофильные жесткокрылые Висимского заповедника // Экология процессов биологического разложения древесины. Екатеринбург : Изд-во «Екатеринбург», 2000. С. 110–133.
21. Красуцкий Б. В. Мицетофильные жесткокрылые (Insecta, Coleoptera) Ильменского заповедника. Система «Грибы–насекомые» // Изучение беспозвоночных животных в заповедниках. Проблемы заповедного дела. М., 2001. Вып. 10. С. 126–150.
22. Сахаров Н. Л. Жуки окрестностей Мариинского земельного урочища и других мест Саратовской губернии // Тр. Саратов. о-ва естествоисп. и любит. природы. 1903. Т. 4, вып. 2. 86 с.
23. Сажнев А. С. К фауне жуков-чернотелок (Coleoptera : Tenebrionidae) Саратовской области // Рус. энтомол. журн. М., 2012. Вып. 21, № 1. С. 39–43.
24. Володченко А. Н. Материалы к познанию фауны сапроксильных жесткокрылых памятника природы «Арзянский бор» // Биоразнообразие и антропогенная трансформация природных экосистем : материалы Всерос. науч.-практ. конф. (Балашов, 16–17 окт. 2014 г.). Саратов : Саратов. источник, 2014. С. 30–33.
25. Володченко А. Н., Сажнев А. С. Новые и малоизученные ксилофильные жесткокрылые (Coleoptera) Сара-



- товской области // Эверсманния. Энтомологические исследования в России и соседних регионах. 2016. Вып. 47–48. С. 11–18.
26. Сажнев А. С., Аникин В. В. Использование ловушки Малеза при изучении фауны жесткокрылых (Insecta : Coleoptera) на территории национального парка «Хвалынский» Саратовской области // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 1. С. 79–85. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-1-79-85
27. Лессо Т. Грибы. Определитель. М. : АСТ, Астрель, 2003. 304 с.
28. Косолапов Д. А. Афиллофороидные грибы среднетаежных лесов Европейского Северо-Востока России. Екатеринбург : УрО РАН, 2008. 232 с.
29. Кочетова О. С., Семёнов В. Б., Зотов В. А., Щигель Д. С. Мониторинг мицетобионтных жесткокрылых насекомых с помощью ловушки Кайла // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2011. № 4. С. 22–25.

**The Preliminary Ecological-Faunistic Data about Fungivorous Beetles (Insecta: Coleoptera) of Saratov Province**

**A. S. Sazhnev, A. A. Mironova, V. V. Anikin**

Alexey S. Sazhnev, ORCID 0000-0002-0907-5194, Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavl Province, 152742, Russia, sazh@list.ru

Anastasia A. Mironova, ORCID Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, maa9898@mail.ru

Vasilii V. Anikin, ORCID 0000-0001-8575-5418, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, anikinvasiliiv@mail.ru

Until this article in the Saratov Province special studies of fungivorous beetles fauna of Coleoptera was carried out. The collection material was conducted by the authors in the spring and summer of 2017 with fruiting bodies of different species of xylotrophic Basidiomycetes of the families Polyporaceae and Fomitopsidaceae on the territory of 4 districts of the Saratov Province (Voskresenskiy, Khvalynskiy, Saratovskiy, Engelskiy). As a result, on 4 species of xylotrophic fungi were found 13 species of Coleoptera from 6 families. On two species of fungi dominated the species *Dacne bipustulata*, his share on *Fomitopsis pinicola* was 87%, and on *Polyporus squamosus* – 65%. The most populated were the fruit bodies of *Polyporus squamosus* both at the level of diversity of species, and the total number of collected Coleoptera, the least – *Fomes fomentarius*. Among determined Coleoptera were dominated the obligate mycetophages, among which dominated myceto-saprophages – darkling beetles *Neomidia haemorrhoidalis* (Fabricius, 1787) and *Pentaphyllus chrysomeloides* (Rossi, 1792). The smallest was a group of specialized predators (hunting on the inhabitants of fungi), which was represented by the species – *Corticeus (Corticeus) bicolor* (Olivier, 1790).

**Key words:** fauna, beetles, fungi, Basidiomycetes, Saratov Province.

**Образец для цитирования:**

Сажнев А. С., Миронова А. А., Аникин В. В. Предварительные эколого-фаунистические данные о мицетофильных жесткокрылых (Insecta: Coleoptera) Саратовской области // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 336–340. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-336-340

**Cite this article as:**

Sazhnev A. S., Mironova A. A., Anikin V. V. The Preliminary Ecological-Faunistic Data about Fungivorous Beetles (Insecta: Coleoptera) of Saratov Province. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 336–340 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-336-340



УДК 159.931+57.087.3

## ОСОБЕННОСТИ ОКУЛОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ У СТУДЕНТОВ ПРИ РЕШЕНИИ ЗАДАЧ

А. С. Чеботок, Е. М. Зинченко

Чеботок Анна Сергеевна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [anya\\_chebotok@mail.ru](mailto:anya_chebotok@mail.ru)

Зинченко Екатерина Михайлова, кандидат биологических наук, ассистент факультета психологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, [odonata1108@yandex.ru](mailto:odonata1108@yandex.ru)

Глазодвигательная активность является необходимым компонентом психических процессов человека, благодаря которым происходит получение, преобразование и использование зрительной информации. Регистрируя и анализируя движения глаз, мы способны получить доступ к скрытым (внутренним) формам активности, которые протекают исключительно быстро и неосознанно. Благодаря появлению в России современных айтрекеров интерес к окулomotorной тематике в настоящее время значительно возрос. Представлены результаты исследования окулomotorной активности (ОМА) студентов при решении логических задач. Исследуемым предлагалось решить вербальные и математические задачи на специальном приборе – Eye-Tracker. По результатам анализа основных параметров окулomotorной активности, таких как моргание, фиксация и саккады, были выявлены значимые различия данных характеристик. Также в ходе эксперимента по результатам тестирования был определен уровень логического мышления студентов психологического факультета. Большинство исследуемых справились с решением вербальных заданий, показав хорошие результаты. При выполнении же математических задач, многие не успели сделать и больше половины. Полученные результаты эксперимента неокончательны, планируется дальнейшее исследование, анализ и корреляционная обработка окулomotorной активности студентов.

**Ключевые слова:** окулomotorная активность, бинокулярный трекинг глаз, фиксация, саккады, глазодвигательная активность, психофизиологические особенности.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-341-344

Все дети от природы награждены огромным потенциалом. В каждом ребенке кроются удивительные возможности и способности. И главная задача родителей и учителей помочь учащимся их раскрыть.

Образование в России как школьное, так и дошкольное в основном построено на развитии левого полушария ребенка, то есть на полном дискретном анализе и логике. Но при этом происходит игнорирование правого полушария, что вдвое может урезать способности ребенка, так как дети с развитым правым полушарием обладают фотографической памятью, способны запоминать

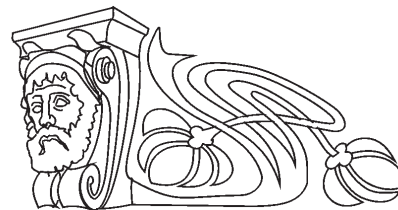
большие объёмы информации, имеют уникальные вычислительные и лингвистические способности. При решении самостоятельных работ, предоставленных преподавателем, не все учащиеся могут справиться с заданиями сразу. Возможно, считывание информации происходит по-разному, и дети порой просто не успевают.

Мы решили изучить восприятие учащимися заданий посредством оценки окулomotorной активности (ОМА). Ведь именно ОМА является необходимым компонентом психических процессов, связанных с получением, преобразованием и использованием зрительной информации [1].

Важнейшим фактором, обуславливающим характеристики глаз, является задача, решаемая наблюдателем. Зная, куда направлен взор, как долго (маршрут) и какова траектория движения, можно реконструировать психологическую структуру ситуации и динамику решения задачи. Это обстоятельство является основанием окулографии в качестве метода психологического исследования [1]. Цель нашего исследования – оценить особенности окулomotorной активности у студентов при решении логических задач.

Исследование проводилось в Саратовском государственном университете имени Н. Г. Чернышевского. В эксперименте приняли участие 20 студентов в возрасте 19–20 лет, обучающихся на психологическом факультете. Уровень логического мышления оценивался по результатам тестирования.

Экспериментальная часть исследования была основана на бинокулярной регистрации окулomotorной активности при помощи стационарной системы бинокулярного трекинга глаз Eye-Tracker. В центре экрана монитора высвечивалась фиксационная точка, по мере готовности участника к решению заданий на ее месте предъявлялся стимульный материал. Расстояние между обследуемым и монитором со встроенной в него системой удаленной регистрации движения глаз составляло 65–70 см. По координатам центра зрачка и роговичного блика, а также по результатам калибровки рассчитывается направление взора, привязанное к рассматриваемому наблюдателем изображению. Средняя продолжительность исследования одного студента составила – 10–12 мин. Первичные данные основных характеристик движения взора были обработаны с помощью программы ВеGaze.





Наше исследование состояло из двух этапов. На первом этапе осуществлялись фиксация и анализ глазодвигательной активности при решении вербальных задач (группа 1). Работа включала в себя 20 стимулов, построенных по принципу «найди лишнее слово». Второй этап также состоял в фиксации и анализе глазодвигательной активности, но уже при решении математических задач (группа 2). Для решения предлагалось 18 логических заданий, каждое из которых содержало 2 логические посылки. На каждый этап было отведено по 5 минут. Обработка количественных показателей осуществлялась при помощи статистического пакета SPSS. Для выявления значимости различий параметров окуломоторной активности между двумя группами использовался статистический критерий Манна–Уитни.

По результатам решения стимулов было установлено количество ошибок и присвоен определенный уровень логического мышления студентам каждой группы. При решении вербальных задач студенты справились со всеми заданиями и в среднем набрали 18 баллов из возможных 20. Полученные данные характеризуют уровень логического мышления как высокий. При решении математических задач студентов с низким уровнем логического мышления значительно больше. По результатам статистического анализа были выявлены различия в окуломоторной активности у студентов 1- и 2-й группы (рис. 1).

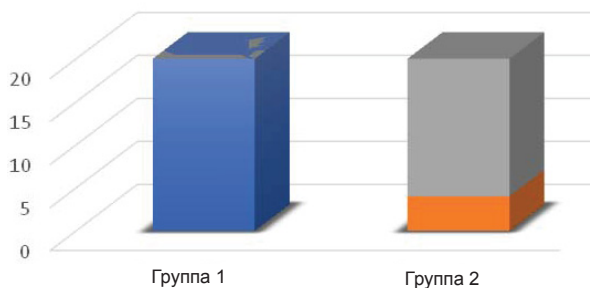


Рис. 1. Результаты распределения студентов по уровню логического мышления при выполнении логических задач:  
■ – высокий, ■ – средний, ■ – низкий

Анализировались следующие пространственно-временные параметры ОМА:

- Blink Count – количество морганий;
- Fixation Count – количество фиксаций;
- Fixation Frequency [count/s] – частота фиксаций;
- Fixation Duration Total [ms] – общая продолжительность фиксаций;
- Fixation Duration Average [ms] – средняя продолжительность фиксаций;

- Saccade Count – количество саккад;
- Saccade Frequency [count/s] – частота саккад;
- Saccade Duration Total [ms] – общая продолжительность саккад;
- Saccade Duration Average [ms] – средняя продолжительность саккад;
- Saccade Velocity Average [°/s] – средняя скорость саккад.

В ходе исследования параметров морганий у студентов при решении логических задач было выявлено, что участники 2-й группы имеют существенно более высокие значения таких характеристик (табл. 1), как количество и общая продолжительность морганий, в связи с этим время, затраченное для выполнения заданий, больше, чем у 1-й группы. Исходя из этого можно говорить о более высокой эмоциональной вовлеченности студентов при решении математических задач, чем при выполнении вербальных.

Таблица 1

**Результаты измерений параметров морганий у студентов при решении логических задач**

Параметр	Группа	
	1-я	2-я
Время, мс	8462±1413	20433±7811**
Количество морганий	1,83±0,58	8,37±3,16**
Общая продолжительность морганий, мс	322,8±118,4	1321±621,4**

Примечание. \*\*разница достоверна при  $p \leq 0,01$  по сравнению с 1-й группой.

По результатам измерений параметров фиксаций у студентов при решении логических задач (табл. 2) наибольшее количество фиксаций отмечено во 2-й группе, а также общая продолжительность, общая и средняя дисперсия фиксаций выше в данной группе.

Таблица 2

**Результаты измерений параметров фиксаций у студентов при решении логических задач**

Параметр	Группа	
	1-я	2-я
Количество фиксаций	25,65±4,65	61,62±22,35**
Общая продолжительность фиксаций, мс	6295±1066	14578±5723**
Общая дисперсия фиксаций	1794±409,9	5920±2615**
Средняя дисперсия фиксаций	69,05±4,33	91,95±12,14**

Примечание. \*\*разница достоверна при  $p \leq 0,01$  по сравнению с 1-й группой.

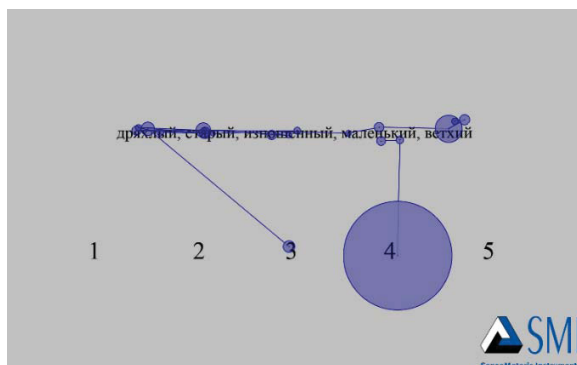


По снимкам экрана прибора (рис. 2) мы можем наглядно проследить разницу в фиксации у исследуемых. Данные результаты могут свидетельствовать о расфокусированности их внимания.

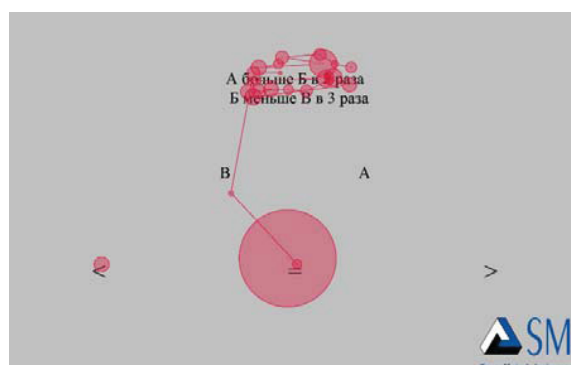
При анализе такой характеристики ОМА, как саккады у студентов 2-й группы было зарегистрировано большее их количество и общая продолжительность (табл. 3). Длина пройденного пути имеет также наиболее высокие значения по сравнению с 1-й группой. Общая амплитуда

и скорость, а также максимальная амплитуда и скорость саккад наиболее выражена у студентов при решении математических задач. Полученные данные могут говорить об их эмоциональной вовлеченности в решение данного стимула.

На снимках экрана прибора (рис. 3) можно проследить разницу в траектории движения саккад. Мы можем говорить о том, что чем сложнее рассматриваемый объект, тем сложнее траектория движения глаз [2].



а



б

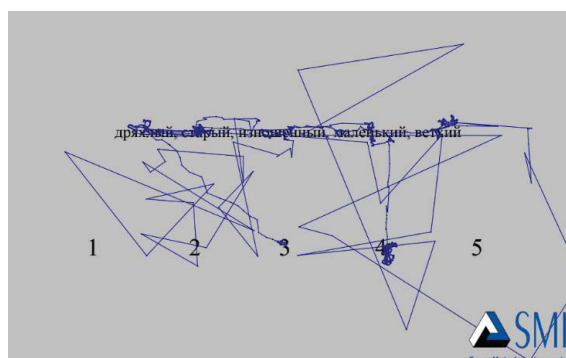
Рис. 2. Фиксация взора студента при решении задачи: а – вербальной, б – математической

Таблица 3

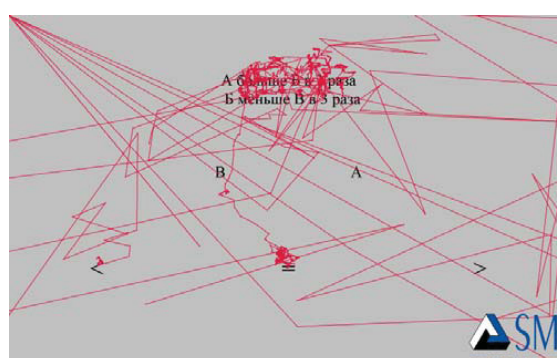
**Результаты измерений параметров саккад у студентов при решении логических задач**

Параметр	Группа	
	1-я	2-я
Длина пройденного пути, пиксели	4197±921,5	7808±2714**
Количество саккад	31,88±5,32	75,99±26,34**
Общая продолжительность саккад, мс	1366±239,2	3123±1159**
Общая амплитуда саккад, °	124,5±24,43	338,1±118,5**
Максимальная амплитуда саккад, °	21,79±4,4	47,3±11,57**
Общая скорость саккад, °/с	2500±467,5	6338±1987**
Максимальная скорость саккад, °/с	272,5±43,75	501,2±84,41**

Примечание. \*\*разница достоверна при  $p \leq 0,01$  по сравнению с 1-й группой.



а



б

Рис. 3. Движение саккад взора студента при решении задачи: а – вербальной, б – математической



По результатам данного исследования были сделаны следующие выводы:

1) уровень логического мышления характеризуется как высокий при решении вербальных заданий;

2) при выполнении математических задач у большинства студентов низкий уровень логического мышления;

3) на решение вербальных задач ушло меньшее количество времени из допустимого;

4) большое количество морганий, фиксаций, саккад выявлено у студентов при выполнении математических задач, что может свидетельствовать о более высокой эмоциональной вовлеченности.

Результаты исследования могут быть применены преподавателями при создании различного рода заданий с учетом индивидуальных психофизиологических особенностей учащихся. В дальнейшем планируется произвести корреляцию и установить взаимосвязь между уровнем логического мышления и ОМА, а также провести сравнение студентов различного пола и специальности для сравнительного анализа.

#### Список литературы

1. Барбанициков В. А., Ананьева К. И. Айттрекинг в психологической науке и практике. М. : Когито-Центр, 2015. 410 с.
2. Покровский В. М., Коротько Г. Ф. Физиология человека : учебник. 2-е изд., перераб. и доп. М. : Медицина, 2007. 656 с.

#### Образец для цитирования:

Чеботок А. С., Зинченко Е. М. Особенности окулomotorной активности у студентов при решении задач // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 341–344. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-341-344

#### Cite this article as:

Chebotok A. S., Zinchenko E. M. Peculiarities of Oculomotor Activity in Students While Solving the Problems. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 341–344 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-341-344

#### Peculiarities of Oculomotor Activity in Students While Solving the Problems

A. S. Chebotok, E. M. Zinchenko

Anna S. Chebotok, ORCID 0000-0001-9760-5476, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, anya\_chebotok@mail.ru

Ekaterina M. Zinchenko, ORCID 0000-0001-7926-1681, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, odonata1108@yandex.ru

Oculomotor activity is a necessary component of the human mental processes, thanks to which the acquisition, transformation and use of visual information takes place. Therefore, by registering and analyzing eye movements, we are able to access the hidden (internal) forms of activity that occur extremely quickly and unconsciously. Thanks to the appearance in Russia of modern trainees, interest in the oculomotor theme has now increased significantly. In this paper, the results of the study of oculomotor activity (OMA) of students in solving logical problems are presented. The researchers were asked to solve verbal and mathematical problems on a special device - Eye - Tracker. Based on the analysis of the main parameters of oculomotor activity, such as blinking, fixation and saccades, significant differences in these characteristics were revealed. Also, in the course of the experiment, according to the results of testing, the level of logical thinking of the students of the psychological faculty was determined. Most of the subjects coped with the decision of verbal assignments, showing good results. While performing the same mathematical tasks, many did not have time to do more than half. The results of the experiment are not final, further research, analysis and correlation processing of the oculomotor activity of students is planned.

**Key words:** oculomotor activity, binocular eye tracking, fixation, saccades, oculomotor activity, psychophysiological features.



УДК 543.51+ 547.814.5

## ГАЛОФИЛЬНЫЕ И ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ПРОДУЦЕНТЫ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ СОЛЕННЫХ ОЗЕР КАРУН (ЕГИПЕТ) И ЭЛЬТОН (РОССИЯ)



И. М. Ибрахим, С. А. Коннова, Е. Н. Сигида,  
Ю. П. Федоненко, В. И. Сафронова, К. А. Elbanna

Ибрахим Мохаммед Ибрахим, аспирант кафедры биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; Assistant Lecturer of Department Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture Fayoum University (Fayoum, Egypt), ibrahim.egypt2016@yandex.ru

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Konnovasa@yandex.ru

Сигида Елена Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, si\_elena@mail.ru

Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, fedonenko\_yu@ibppm.ru

Сафронова Вера Игоревна, кандидат биологических наук, руководитель Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, v.safronova@rambler.ru

Khaled Abdelrahman Youssef Elbanna, Professor of Department Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture Fayoum University (Fayoum, Egypt); Faculty of Applied Science, Biology Department, Umm Al Qura University (Makkah, KSA)

Микроорганизмы, способные к существованию в высоко засоленных средах, являются продуцентами уникальных по структуре и свойствам соединений, что обуславливает возросший в последнее время интерес исследователей к изучению их биотехнологического потенциала. Целью работы являлся скрининг экзополисахарид-продуцирующих галофильных и галотолерантных микроорганизмов из соленых озер в Египте и России. Для выделения и характеристики штаммов использованы микробиологические, физико-химические методы, световая и просвечивающая электронная микроскопия. Таксономические исследования изолятов проведены на основании анализа культурально-морфологических, биохимических свойств и данных секвенирования 16S рДНК. Из выделенных 104 изолятов микроорганизмов охарактеризованы 49 штаммов-продуцентов экзополисахаридов. Содержание полисахаридов в культуральной жидкости исследуе-

мых микроорганизмов максимально достигало 13.7 мг/мл. Для 16 изолятов установлена видовая принадлежность.

**Ключевые слова:** галофильные и галотолерантные микроорганизмы, экзополисахариды, видовое разнообразие, филогенетические связи.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-345-353

Большая часть земной поверхности покрыта Мировым океаном, характеризующимся высоким разнообразием населяющей его биоты, что дает исследователям шанс обнаружить микроорганизмы, продуцирующие соединения с уникальными свойствами и химическим составом [1]. В то же время гиперсоленые среды, такие как естественные соленые и соляные озера, представляют экосистемы с меньшим разнообразием, но более высокой плотностью сообществ [2]. Эти относительно просто организованные экосистемы по сравнению с морскими или пресноводными представляют удобный объект исследования фундаментальных аспектов биоразнообразия, селекции, биогеографии и эволюции микроорганизмов. Среди входящих в их состав галотолерантных и галофильных микроорганизмов встречаются представители трех основных доменов – эукариоты, археи и бактерии [3], причем среди последних представлены аэробы, факультативные и облигатные анаэробы, как грамотрицательные, так и грамположительные [4].

По способности обитать в средах с различными концентрациями хлорида натрия выделенные и охарактеризованные до настоящего времени галофильные микроорганизмы разделяют на четыре группы: слабые (2–5% NaCl), умеренные (5–15% NaCl), экстремальные (15–32%) и пограничные экстремальным галофилами (>15% NaCl). Галотолерантные (осмофильные) микробы не требуют хлорида натрия для своего роста, но могут адаптироваться к довольно высоким (до 15%) концентрациям соли [5–7].

Галофильные микроорганизмы представляют перспективный объект исследований с целью дальнейшего использования их биотехнологического потенциала. Среди галобактерий часто встречаются продуценты экстраклеточных



ферментов. Например, из различных образцов соли, собранных компанией «Emisal salt company» в озере Карун (Египет), были выделены 33 бактериальных изолята – продуценты протеаз и 16 изолятов, производящих целлюлазы [8, 9].

Вызывают несомненный интерес и экзополисахариды (ЭПС) галобактерий. Сазерленд впервые использовал термин «экзопполисахарид» для описания высокомолекулярных углеводных полимеров, производимых именно морскими бактериями [10]. В ходе адаптации к существованию в засоленных условиях обитания у многих микроорганизмов происходят модификации молекул, формирующих поверхность клетки, например, фосфолипидов [10]. Охарактеризованы ЭПС некоторых галофильных/галотолерантных микроорганизмов, среди которых преимущественно представлены археи и морские бактерии [11–14]. Микробиом соленых и соляных озер, проявляющих различия в химическом составе, уровне техногенного загрязнения и т.д., исследован недостаточно и, как следствие, ограничена информация о продуцируемых микроорганизмами ЭПС.

Благодаря уникальной структуре и проявляемым физико-химическим свойствам микробные полисахариды широко используются в пищевой, фармацевтической и других отраслях производства. Некоторые из них являются эмульгаторами, стабилизаторами, загустителями, желирующими агентами, коагулянтами, компонентами смазок, материалами для пленочных покрытий и пр. [15].

Целью настоящего исследования являлся скрининг галофильных микроорганизмов, изолированных из соленых озер Карун (мухафаза Эль-Файюм, Египет) и Эльтон (Волгоградская область, Россия), направленный на выявление наиболее перспективных штаммов в отношении продукции ЭПС, с дальнейшей их идентификацией на основании данных фенотипического исследования и анализа нуклеотидной последовательности генов 16S рДНК.

### Материалы и методы

Галофильные изоляты выделяли с использованием модифицированной среды S-G (Sehgal and Gibbons, 1960). Отдельно подготавливали два раствора, содержащих в пересчете на конечный объем среды (1 л) следующие компоненты: А – 200 мл раствора глюкозы (1%), сахарозы (1%), дрожжевого экстракта (1%), который трижды дробно пастеризовали (100°C, 15 мин); Б – 800 мл раствора, NaCl (в зависимости от варианта опыта: 0, 5, 10, 15 или 25%), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2%), KCl (0.2%), цитрат натрия Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (0.3%), который автоклавировали (121°C, 30 мин). После стерили-

зации растворы смешивали и титровали 1н NaOH до конечного значения pH 7.5. Для культивирования микробных изолятов использовали жидкую и агаризованную (1.5% бактоагара) среду.

Для получения накопительной культуры в среду S-G (90 мл) добавляли образцы в жидкой (10 мл) либо твердой (10 г) форме, инкубировали при 30 и 37°C в течение 3–7 суток на ротационном шейкере (200 об/мин). Затем из аликвот последовательных разведений каждой накопительной культуры делали высевы на твердую среду S-G и инкубировали при 30 и 37°C в течение 2 недель. ЭПС-продуцирующие изоляты отбирали по способности к образованию ослизненных колоний, которые рассеивали на свежую среду для получения отдельных колоний. Чистоту культур контролировали с помощью световой микроскопии. Хранение отобранных микробных культур осуществляли при –70°C в среде S-G, содержащей 20% глицерина. Штаммы депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ).

Для каждой изолированной культуры микроорганизмов описывали морфологию колоний, осуществляли окрашивание по Граму согласно процедуре [16], также выполняли тесты с гидроксидом калия [17]. Окрашивание спор было выполнено по Шефферу–Фултону и др. в соответствии с [17]. Подвижность изолятов исследовали микроскопическими методами, морфология клеток оценивалась с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на микроскопе Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Для отнесения галофильных микроорганизмов к одной из четырех групп изоляты тестируют на способность к росту на плотной S-G среде с различным содержанием NaCl (0, 5, 10, 15 и 25%) [18].

Из жидкой культуры на стационарной фазе роста клетки осаждали центрифугированием (4400 об/мин, 40 мин). Содержание ЭПС в культуральной жидкости определяли после осаждения двумя объемами охлажденного 96% этанола (4°C, 12 ч). Осадок ЭПС дважды промывали этанолом, а затем диализовали в течение 72 ч против дистиллированной воды через мембрану с пределом исключения 14 кДа («Росмедбио», Россия). Концентрацию углеводов в ЭПС определяли методом [19] с использованием глюкозы в качестве стандарта.

Идентификацию микроорганизмов осуществляли на основании данных анализа культурально-морфологических и биохимических свойств (GENIII MicroPlate BioLog, США),





а также последовательности гена 16S рРНК, амплификацию которого проводили с использованием пар универсальных праймеров: 5'GCCGGAGGTCATTGCTAGTGGAGTC3' и 5'AGGAGGTGATCCAGCCGCAGATTCC3' [20] и fD1 5'AGAGTTTGTATCC-TGGCTCAG3' и rD1 5'CTTAAGGAGGTGATCCAGCC3' [21].

ПЦР выполняли в течение 30 циклов: денатурация 30 с при 95°C, отжиг 1 мин при 40°C и полимеризация в течение 2 мин при 72°C. Продукты ПЦР (~1540 п. н.) разделяли электрофорезом в агарозном геле и извлекали с помощью набора Nucleotrap («Macherey-Nagel», Германия). Секвенирование осуществляли на коммерческой основе в компании «Синтол» (г. Москва), а также в рамках договора о научном сотрудничестве с ФГБНУ ВНИИСХМ (г. Санкт-Петербург).

Сравнение полученных последовательностей 16S рДНК с таковыми в базе данных GenBank осуществляли с использованием онлайн сервиса Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Построение филогенетических дендрограмм методом присоединения соседей осуществляли с использованием программного пакета FASTMe (<https://galaxy.pasteur.fr>). Статистическую достоверность

дендрограмм рассчитывали с помощью «bootstrap» анализа с использованием построения 1000 альтернативных деревьев. *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (NR114673) был использован в качестве референтного штамма – представителя неродственной группы.

### Результаты и их обсуждение

Из восьми образцов соли оз. Карун (Египет, 29°27'13»с.ш. 30°34'51» в.д.), полученных в 2015–2016 гг. из различных источников, включающих природный неокрашенный соляной раствор, окрашенные соляные растворы из искусственных солнечных соляных прудов, прибрежную и донную почвы солнечных соляных прудов, а также необработанную соль («Emisal Salt Company», Египет), было выделено 78 изолятов, из которых 39 оказались продуцентами ЭПС. Из 26 изолятов, выделенных в 2016 г. из трех различных соляных проб оз. Эльтон (Россия, 49°08'с.ш. и 46°42' в.д.), ЭПС продуцировали 10 изолятов.

ЭПС-продуцирующие изоляты характеризовались способностью к образованию на агаризованной среде S-G, содержащей разные концентрации NaCl, мукоидных колоний (рис. 1).

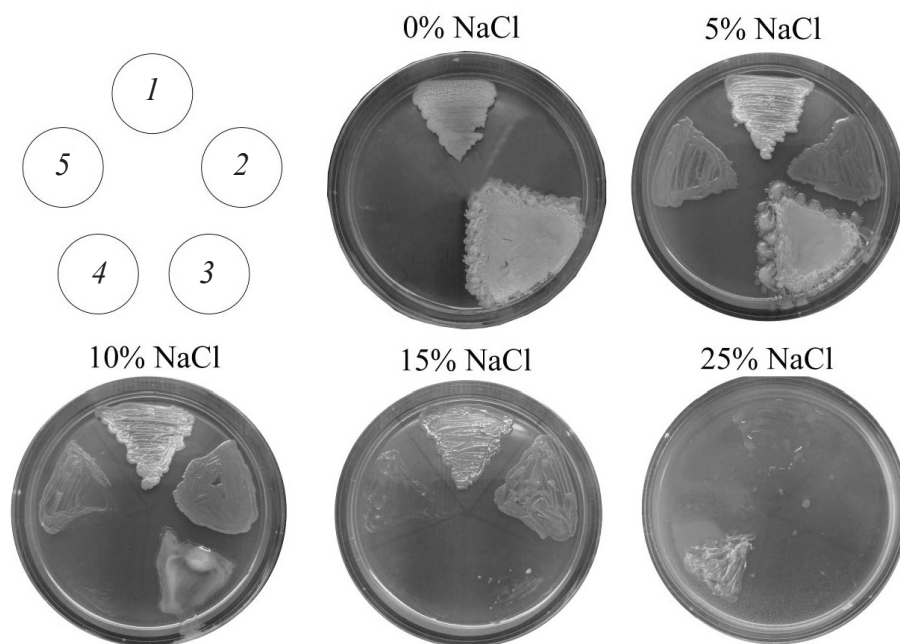


Рис. 1. Рост колоний галофильных и галотолерантных изолятов на средах с различным содержанием соли: 1 – EG1QL3; 2 – EG 9S8QL; 3 – EG1QL30; 4 – EG3QL57; 5 – RU5S2EL

При исследовании отобранных культур методом ПЭМ наблюдали микробные клетки, окруженные слоем слизи (рис. 2).

По устойчивости к различному содержанию NaCl в среде культивирования исследуемые

микроорганизмы были условно разделены на четыре группы (табл. 1), причем основным критерием при отнесении каждого изолята к определенной группе являлась оптимальная для роста бактериальной культуры концентрация NaCl.

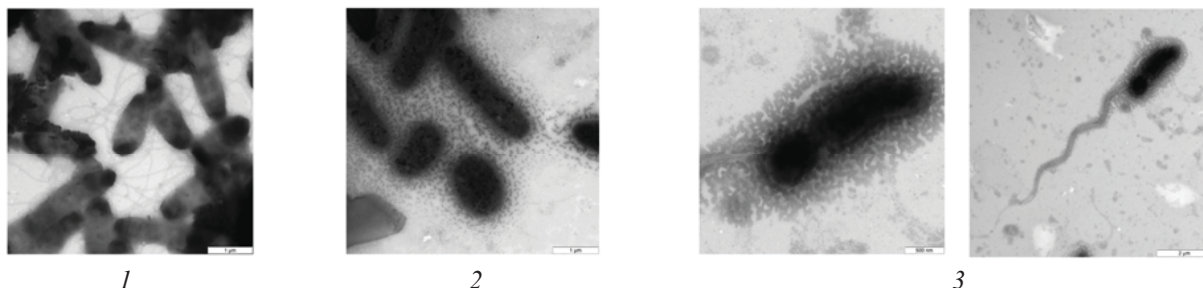


Рис. 2. Морфология клеток изолятов, продуцирующих ЭПС, визуализированная методом ПЭМ: 1 – EG1QL3; 2 – EG3QL57; 3 – EG1QL30

Исследования показали, что в составе первой группы только четыре изолята не демонстрировали рост при концентрациях соли ниже 25%, в то время как изоляты EG4QL54 и EG1QL53 были способны расти в диапазоне 15–25% NaCl, а изолят RU2EL38 – 10–25% NaCl. Таким образом, все семь изолятов первой группы можно рассматривать как экстремальные галофилы. Микроорганизмы, отнесенные ко второй группе, демонстрировали активный рост при 15% NaCl, за исключением EG1QL3, который способен расти в широком диапазоне концентраций NaCl (0–15%). Часть изолятов третьей (EGP5QL1, RU2EL5, EGP2QL34, EGP6QL35, EGP5QL12) и четвертой групп (EGP6QL14, RU2EL4, EGP3QL11, RU2EL1) обнаружили способность к росту как в среде с соответствующей концентрацией NaCl (10 и 5%), так и в среде, не содержащей соли, а часть изолятов этих групп (EG24S8QL, EG18S7QL, EGP1QL18, EG27S8QL, EG1HP4QL, EG33S7QL, EGP3QL10, EG26S8QL) демонстрировала слабый рост при 15% NaCl.

Следует отметить, что среди выделенных культур грамположительных бактерий было приблизительно в два раза больше, чем граммотрицательных. Только семь изолятов характеризовались отсутствием подвижности и все они относились к грамположительным бактериям. Соотношение споро- и неспорообразующих микроорганизмов было примерно одинаковым.

При микроскопическом исследовании было выявлено, что большинство изолятов представляли собой короткие либо длинные палочки. Исключение составили три штамма микроорганизмов первой группы, которые были плейоморфными (EG4QL54, EG3QL57) и кокками (RU2EL38), а также три штамма бактерий третьей группы, которые были кокками (EGP5QL1, RU1EL6) и диплококками (EGP1QL18). Сведения о культуральных свойствах исследуемых изолятов на твердой питательной среде представлены в табл. 1.

Все изоляты охарактеризованы по продукции ЭПС, которая достаточно сильно отличалась у разных штаммов (от 0.1 до 13.7 мг в мл культуральной среды (см. табл. 1)). Следует отметить, что проведенный скрининг характеризует способность к продукции ЭПС у выделенных штаммов только в общих чертах, поскольку потенциал этих микроорганизмов может быть более высоким при оптимизации условий их культивирования. Тем не менее уровень синтезированных исследуемыми микроорганизмами ЭПС согласуется с таковым для других галофильных бактерий [22].

Отбор штаммов для проведения дальнейших исследований осуществляли, учитывая их способность к продукции ЭПС (мг/мл) в пределах каждой группы (см. табл. 1). Поскольку группы различались количеством отнесенных к ним штаммов, то из первой и второй групп было отобрано по три изолята – EG3QL57, EG3QL50, RU2EL38 и EG1QL3, EG9S8QL, EGP4QL47 соответственно. Из третьей группы были отобраны шесть изолятов – EG1QL30, EGP5QL12, EG24S8QL, EG18S7QL, EGT5QL15 и EG2QL8, а из четвертой – двенадцать изолятов: EG1HP4QL, RU2EL4, EGP5QL39, RU3EL3, RU5S2EL, EG6S8QL, RU2EL1, EG19S7QL, EG27S8QL, EG30S8QL, EG33S7QL и EG26S8QL.

По результатам исследования последовательности нуклеотидов генов 16S рДНК для шестнадцати из отобранных изолятов установлена принадлежность к десяти родам, восемь из которых – представители бактерий: *Bacillus*, *Salinibacillus*, *Virgibacillus*, *Piscibacillus*, *Halobacillus*, *Marinococcus*, *Chromohalobacter*, *Halomonas*, а два – архей: *Haloterrigena* и *Halobacterium*. Как следует из приведенных данных, на рис. 3 и в табл. 2 гомология нуклеотидной последовательности генов 16S рДНК исследуемых изолятов с таковой наиболее близких видов (база данных GenBank) для большинства штаммов составляла от 98.5 до 99%, в некоторых случаях – 100%.



Таблица 1

**Характеристика морфологии колоний и клеток, продуцирующих ЭПС галофильных и галотолерантных микроорганизмов**

№	Изолят	Морфология колоний	ЭПС, мг/мл	Окраска по Граму	Подвижность	Спорообразование
<b>Группа 1: экстремальные галофилы (25% NaCl)</b>						
1	EG2QL55	Круглые розовые ослизненные	0.4	-	+	-
2	EG3QL50	Точечные розовые ослизненные	1.5	-	+	-
3	RU1EL16	Круглые ярко-красные ослизненные	0.5	+	+	-
4	RU2EL38	Точечные розовые ослизненные	0.9	+	-	-
5	EG4QL54	Круглые оранжевые ослизненные	0.3	+	+	-
6	EG3QL57	Круглые красные ослизненные	2.3	-	+	-
7	EG1QL53	Круглые розовые ослизненные	0.2	-	+	-
<b>Группа 2: пограничные экстремальным галофилы (15% NaCl)</b>						
8	EGP3QL23	Круглые желтые маслянистые	0.4	+	+	+
9	EG9S8QL	Круглые бежевые ослизненные	1.5	-	+	-
10	EGT2QL27	Точечные кремовые ослизненные	0.4	+	+	+
11	EGP5QL24	Круглые белые маслянистые	0.1	+	+	-
12	RU1EL3	Неправ. бежевые маслянистые	0.9	+	+	+
13	EGP3QL2	Круглые белые ослизненные	0.6	+	-	+
14	EGP4QL47	Круглые кремовые маслянистые	1.1	+	+	+
15	EG1QL3	Круглые кремовые ослизненные	13.7	-	+	-
<b>Группа 3: умеренные галофилы 10% NaCl</b>						
16	EGT5QL15	Круглые светло-серые маслянистые	2.0	+	+	+
17	EGP5QL1	Точечные белые ослизненные	0.3	+	-	-
18	RU2EL5	Круглые оранжевые маслянистые	1.1	+	+	+
19	EGT2QL37	Точечные кремовые маслянистые	0.6	-	+	-
20	EG24S8QL	Круглые бежевые ослизненные	2.7	-	+	-
21	EG2QL8	Точечные желтые ослизненные	1.8	+	+	+
22	EGP2QL34	Круглые белые маслянистые	0.9	+	+	+
23	EG1QL30	Неправильные белые ослизненные	9.3	+	+	+
24	EG18S7QL	Круглые кремовые ослизненные	2.5	-	+	-
25	EGP6QL35	Точечные кремовые маслянистые	0.2	+	+	-
26	RU1EL6	Неправильн. бежев. ослизненные	0.8	+	-	-
27	EGT2QL36	Круглые бежевые ослизненные	0.9	+	+	+
28	EGP1QL18	Точечные белые маслянистые	0.4	+	-	-
29	EGP5QL12	Круглые белые ослизненные	5.7	+	+	+
30	RU3EL7	Круглые белые ослизненные	1.2	+	+	+
<b>Группа 4: слабые галофилы (5% NaCl)</b>						
31	EG27S8QL	Круглые белые ослизненные	1.8	-	+	-
32	RU3EL3	Круглые белые ослизненные	2.9	+	+	+
33	EGP6QL14	Круглые белые ослизненные	0.7	+	+	+
34	EGT4QL13	Неправильн. кремов. маслянистые	1.1	+	-	+
35	EG6S8QL	Неправильные белые ослизненные	2.3	-	+	-
36	EG1HP4QL	Круглые желтые маслянистые	5.2	+	+	+
37	RU2EL4	Круглые белые ослизненные	4.6	+	+	+
38	EGP3QL11	Круглые кремовые маслянистые	0.4	+	+	-
39	EGP5QL39	Неправильные белые ослизненные	4.2	+	+	+
40	EG33S7QL	Круглые белые ослизненные	1.5	-	+	-
41	EGP3QL10	Неправильн. кремов. ослизненные	0.8	-	+	-
42	EGT2QL9	Круглые белые ослизненные	1.3	+	-	+
43	EG30S8QL	Круглые белые ослизненные	1.7	-	+	-
44	RU2EL1	Неправильные белые ослизненные	2.1	+	+	+
45	EGT4QL42	Круглые кремовые маслянистые	0.5	+	+	+
46	EG26S8QL	Круглые бежевые маслянистые	1.5	-	+	-
47	EGT4QL43	Неправильные белые ослизненные	0.2	+	+	+
48	EG19S7QL	Круглые белые маслянистые	1.8	-	+	-
49	RU5S2EL	Круглые коричневые слизистые	2.8	-	+	-

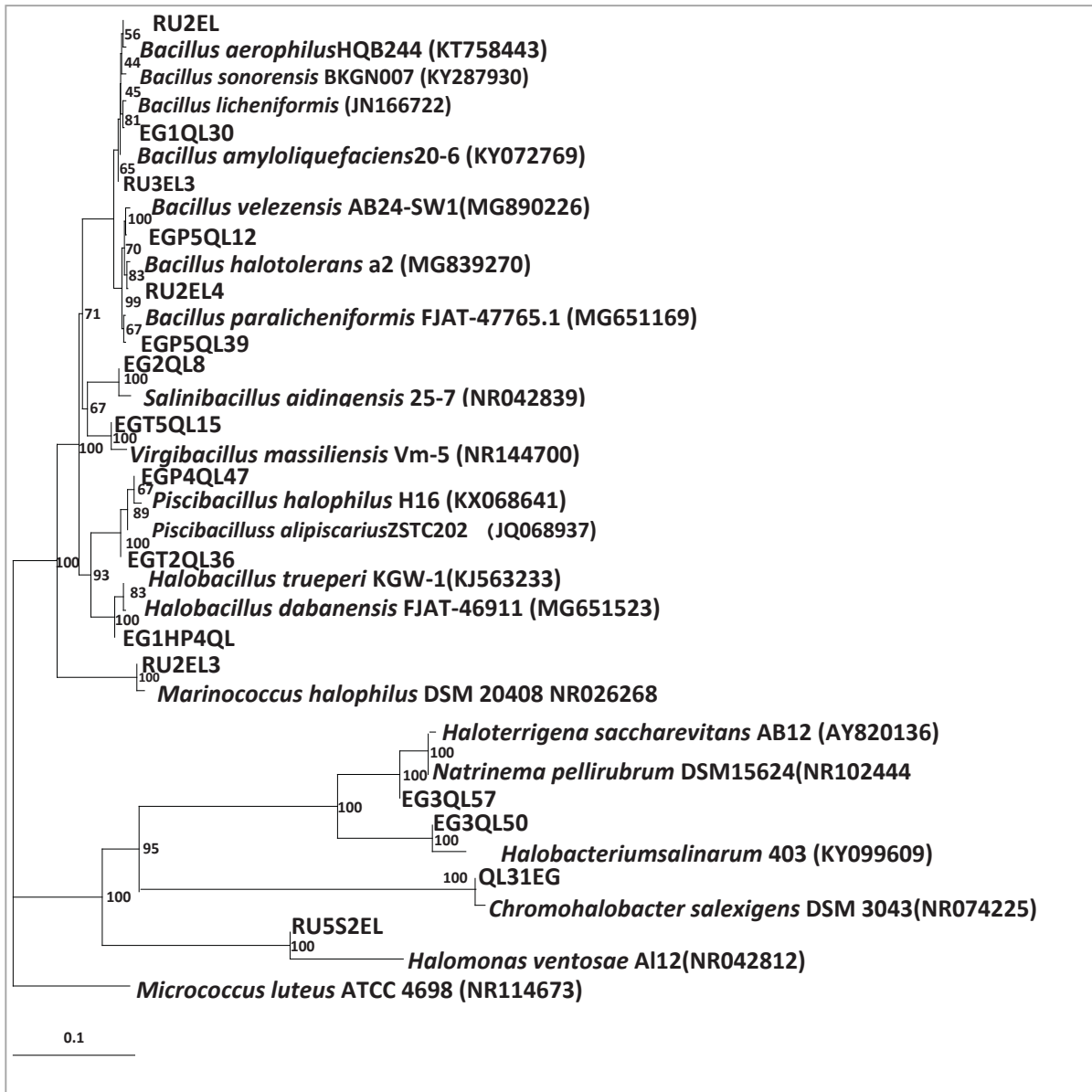


Рис. 3. Дендрограмма филогенетического сходства, построенная на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рДНК выделенных изолятов и других близкородственных микроорганизмов. Для построения использован метод присоединения соседей («neighbor-joining»). Слева внизу дан масштаб эволюционных расстояний. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 альтернативных деревьев

В составе галофильных микроорганизмов, изолированных из образцов соли озер Карун и Эльтон, выявлено присутствие представителей семейств Halobacteriaceae, Halomonadaceae и Bacillaceae (см. табл. 2). В группе экстремальных галофилов были выявлены представители семейства р. *Halobacterium* и *Haloterrigena* (Halobacteriaceae) и *Marinococcus* (Bacillaceae). Во второй группе удалось установить видовую принадлежность двух изолятов – представителей р. *Piscibacillus* (Bacillaceae) и *Chromohalobacter*

(Halobacteriaceae). Среди умеренных и слабых галофилов преобладали представители сем. Bacillaceae: *Bacillus*, *Salinibacillus*, *Virgibacillus*, *Piscibacillus* и *Halobacillus*. Единственный представитель сем. Halomonadaceae – *Halomonas ventosae* был идентифицирован в составе четвертой группы.

Полученные в нашей работе данные о видовом составе засоленных водоемов коррелируют с результатами подобных исследований. Так, Hedi *et al.* [23] проводили скрининг бактери-



Таблица 2

**Определение видовой принадлежности микроорганизмов  
по анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рДНК**

№	Изоляты	Наиболее близкие виды (ID GenBank)	Идентичность, %
<b>Группа 1</b>			
1	EG3QL57	<i>Haloterrigena saccharevitans</i> * (AY820136)	98.9
2	EG3QL50	<i>Halobacterium salinarum</i> *(KY099609)	100.0
3	RU2EL38	<i>Marinococcus halophilus</i> (NR026268)	98.7
<b>Группа 2</b>			
4	EGP4QL47	<i>Piscibacillus halophilus</i> (KX068641)	100.0
5	EG1QL3	<i>Chromohalobacter salexigens</i> (NR074225)	100.0
<b>Группа 3</b>			
6	EG2QL8	<i>Salinibacillus aidingensis</i> (NR042839)	98.8
7	EG1QL30	<i>Bacillus licheniformis</i> (JN166722)	98.9
8	EGT2QL36	<i>Piscibacillus salipiscarius</i> (JQ068937)	98.8
9	EGT5QL15	<i>Virgibacillus massiliensis</i> (NR144700)	100.0
10	EGP5QL12	<i>Bacillus velezensis</i> (MG890226)	98.9
<b>Группа 4</b>			
11	EGP5QL39	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (MG651169)	98.7
12	RU2EL1	<i>Bacillus aerophilus</i> (KT758443)	100.1
13	RU3EL3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KY072769)	98.9
14	EG1HP4QL	<i>Halobacillus dabanensis</i> (MG651523)	100.0
15	RU2EL4	<i>Bacillus halotolerans</i> (MG839270)	98.9
16	RU5S2EL	<i>Halomonas ventosae</i> (NR042812)	98.7

Примечание. \* – представители Archaea.

альных и архейных сообществ в отложениях Эль-Джеридского соленого озера в Тунисе с использованием фенотипических и филогенетических подходов и обнаружили, что члены домена Bacteria принадлежат к родам *Salicola*, *Pontibacillus*, *Halomonas*, *Marinococcus* и *Halobacillus*, тогда как единственный член домена Archaea был представлен родом *Halorubrum*. Исследования разнообразия галофильных бактерий вдоль прибрежных районов Карнатака (Индия) показали преобладание родов *Virgibacillus*, *Halobacillus*, *Salinibacillus*, *Nesterenkonia*, *Pontibacillus* и *Staphylococcus* [24]. Аналогично умеренно галофильные аэробные бактерии, принадлежащие к родам *Halomonas*, *Bacillus* и *Chromohalobacter*, были выделены из многослойных солнечных сателлитов вдоль побережья Гуджарата, Ориссы и Западной Бенгалии, Индия [13].

Таким образом, по результатам исследования показано, что среди изолятов микроорганизмов, адаптированных к существованию в засоленных средах, 47% являются продуцентами полисахари-

дов ЭПС, т.е. для них, очевидно, продукция гликополимеров является стратегией выживания в экстремальных средах. Слой ЭПС защищает клетки от экстремальных условий окружающей среды и часто используется бактериями как источник углерода и энергии во время голодания. Учитывая, что адаптация к различной засолённости, техногенному загрязнению и другим негативным факторам путем изменения состава и продукции ЭПС исследована недостаточно, выделенные штаммы являются весьма перспективными объектами, как для изучения фундаментальных основ процесса адаптации с использованием ЭПС, так и для биотехнологических целей как продуценты полисахаридов.

#### **Благодарности**

Авторы выражают благодарность ведущему инженеру ЦКП «Симбиоз» кандидату химических наук А. М. Бурову за получение микрофотографий ПЭМ, а также доктору биологических наук, профессору А. С. Кашину за



помощь в получении образцов из Озера Эльтон (Волгоградская область, Россия). Депонирование штаммов в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) было выполнено в рамках Программы ФАНО России по развитию и инвентаризации биоресурсных коллекций научными организациями.

#### Список литературы

1. Aneiros A., Garatei A. Bioactive peptides from marine sources. Pharmacological properties and isolation procedures // J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2004. Vol. 15. P. 41–53.
2. Ma Y., Galinski E. A., Grant W. D., Oren A., Ventosa A. Halophiles 2010 : life in saline environments // Appl. Environ. Microbiol. 2010. Vol. 76(21). P. 6971–6981.
3. Gontia-Mishra I., Sapre S., Tiwari S. Diversity of halophilic bacteria and actinobacteria from India and their biotechnological applications // Ind. J. Geo Marine Sci. 2017. Vol. 46 (8). P. 1575–1587.
4. Johnson A., Thurlow L., Zwenger R., Gillock E. Partial characterization of two moderately halophilic bacteria from a Kansas salt marsh // Prairie Nat. 2007. Vol. 39. P. 29–39.
5. Rodriguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Correnzana A. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations // Microb. Ecol. 1981. Vol. 7 (3). P. 235–243.
6. Rodriguez-Valera F. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments // Halophilic Bacteria / ed. F. Rodriguez-Valera. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1988. Vol. 1. P. 3–30.
7. Kushner D. J., Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria // Halophilic Bacteria / ed. F. Rodriguez-Valera. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1988. Vol. 1. P. 109–138.
8. Elbanna K., Ibrahim I. M., Revol-Junelles A.-M. Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt // Extremophiles. 2015. Vol. 19 (4). P. 763–774.
9. Korany A. H., Ali A. E., Essam T. M., Megahed S. A. Optimization of cellulase production by *Halobacillus* sp. QLS 31 isolated from Lake Qarun, Egypt // Appl. Biochem. Biotechnol. 2017. Vol. 183 (1). P. 189–199.
10. Sutherland I. W. Bacterial exopolysaccharides // Adv. Microb. Physiol. 1972. Vol. 8. P. 143–213.
11. Ventosa A., Mellado E., Sánchez-Porro C., Márquez M. C. Halophilic and halotolerant microorganisms from soils // Microbiology of extreme soils / eds. P. Dion, C. S. Nautiyal. Heidelberg : Springer, 2008. P. 85–11.
12. Litchfield C. D. Potential for industrial products from the halophilic Archaea // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 38. P. 1635–1647.
13. Biswas J., Paul A. K. Production of extracellular polymeric substances by halophilic bacterial diversity in multi-pond solar salterns // Chinese J. Biol. 2014. Vol. 12. DOI: 10.1155/2014/205731
14. Casillo A., Lanzetta R., Parrilli M., Corsaro M. M. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16 (2). DOI: 10.3390/md16020069
15. Sutherland I. W. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences // Pure Appl. Chem. 1997. Vol. 69 (9). P. 1911–1917.
16. Dussault H. P. An improved technique for staining halophilic bacteria // J. Bacteriol. 1955. Vol. 70. P. 484–485.
17. Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. Methods for general and molecular bacteriology / American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1994. P. 607–654.
18. Nieto J., Fernandez-Castillo R., Marquez M., Ventosa A., Quesada E., Ruiz Berraquero F. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1989. Vol. 55. P. 2385–2390.
19. DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. Vol. 28. P. 350–356.
20. Hezayen F. F., Tindall B. J., Steinbüchel A., Rehm B. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. Vol. 52. P. 2272–2280.
21. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173 (2). P. 697–703.
22. Fang Y., Ahmed S., Liu S., Wang S., Lu M., Jiao Y. Optimization of antioxidant exopolysaccharides production by *Bacillus licheniformis* in solid state fermentation // Carbohydr. Polym. 2013. Vol. 98 (2). P. 1377–1382.
23. Hedi A., Sadfi N., Fardeau M. L., Rebib H., Cayol J. L., Ollivier B., Boudabous A. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid salt lake (Tunisia) under aerobic conditions // Intern. J. Microbiol. 2009. DOI: 10.1155/2009/731786
24. Jayachandra S. Y., Kumar S. A., Merley D. P., Sulochana M. B. Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium *Salinicoccus* spp. JAS4 producing extracellular hydrolytic enzymes // Rec. Res. Sci. Technol. 2012. Vol. 4 (4). P. 46–49.

#### Exopolysaccharide-Producing Halophilic and Halotolerant Microorganisms Isolated from the Saline Lakes Qarun (Egypt) and Elton (Russia)

I. M. Ibrahim, S. A. Konnova, E. N. Sigida,  
Yu. P. Fedonenko, V. I. Safronova, K. A. Elbanna

Ibrahim M. Ibrahim, ORCID 0000-0002-5374-3508, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia; Fayoum University, Egypt, Fayoum, POBox: 63514 (Egypt), ibrahim.egypt2016@yandex.ru



Svetlana A. Konnova, ORCID 0000-0002-9607-8173, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia; Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, konnovasa@yandex.ru

Elena N. Sigida, ORCID 0000-0002-9223-4589, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, si\_elena@mail.ru

Yulia P. Fedonenko, ORCID 0000-0003-0255-8190, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, fedonenko\_yu@ibppm.ru

Vera I. Safronova, ORCID 0000-0003-4510-1772, All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg; 8, Pushkin, Saint Petersburg, 196608, Russia, v.safronova@rambler.ru

Khaled A. Elbanna, ORCID 0000-0001-6499-9261, Faculty of Agriculture Fayoum University (Fayoum., Postal Address: Fayoum - Fayoum University - Faculty of Agriculture - microbiology Department - POBox: 63514, Egypt; Faculty of Applied Science, Biology Department, Umm Al Qura University (Makkah, KSA). Postal Address: P.O. Box: 7067, Makkah (21955), Saudi Arabia, kab00@fayoum.edu.eg

Microorganisms inhabiting saline environments can produce compounds unique in structure and properties. This ability recently prompted researchers to study the biotechnological potential of

halophiles. This work aimed at screening the exopolysaccharide-producing halophilic and halotolerant microorganisms of two saline lakes, one in in Egypt and the other in Russia. For strain isolation and characterization, we used microbiological and physico-chemical methods, as well as light and transmission electron microscopy. Taxonomy studies of the isolates was studied on the basis of analyses of cultural and morphological characteristics, biochemical properties and 16S rDNA sequencing data. Of 104 isolates adapted to saline environments we selected 49 exopolysaccharide-producing strains. The content of polysaccharides in the culture liquids of the isolated microorganisms reached 13.7 mg/ml<sup>-1</sup>. Sixteen isolates were identified to species.

**Key words:** halophilic and halotolerant microorganisms, exopolysaccharides, species diversity, phylogenetic relationships.

*Acknowledgements: The authors are grateful to the leading engineer of the CCU "Symbiosis" Dr. A. M. Burov for obtaining TEM micrographs and to Professor Dr.Sc. A. S. Kashin for assistance in obtaining samples from the lake Elton (Volgograd Region, Russia). The deposition of strains in the Russian Collection of Agricultural Microorganisms was carried out as part of the FASO Russia program on the development and inventory of bioresource collections by scientific organizations.*

---

**Образец для цитирования:**

Ибрагим И. М., Коннова С. А., Сигида Е. Н., Федоненко Ю. П., Сафронова В. И., Elbanna К. А. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы – продуценты экзополисахаридов, выделенные из соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия) // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 345–353. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-345-353

**Cite this article as:**

Ibrahim I. M., Konnova S. A., Sigida E. N., Fedonenko Yu. P., Safronova V. I., Elbanna K. A. Exopolysaccharide-Producing Halophilic and Halotolerant Microorganisms Isolated from the Saline Lakes Qarun (Egypt) and Elton (Russia). *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 345–353 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-345-353

---



УДК 612

## АНОДНАЯ ТРАНСКРАНИАЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ПОСТОЯННЫМ ТОКОМ УВЕЛИЧИВАЕТ ЦЕРЕБРАЛЬНЫЙ КРОВОТОК, ОКСИГЕНАЦИЮ ТКАНЕЙ И СНИЖАЕТ НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У МЫШЕЙ В НОРМЕ И В ПОЗДНЕМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ



О. А. Брагина, О. В. Семячкина-Глушковская, Д. Е. Брагин

Брагина Ольга Анатольевна, соискатель кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, obragina@salud.unm.edu

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, glushkovskaya@mail.ru

Брагин Денис Евгеньевич, кандидат биологических наук, доцент, медицинская школа Южно-американского университета, США, dbragin@salud.unm.edu

Черепно-мозговые травмы (ЧМТ) являются актуальной проблемой современной медицины, так как вызывают неврологические нарушения у большинства пациентов при отсутствии эффективных, подтверждённых в клинических исследованиях методов терапии. Транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) является многообещающим электротерапевтическим методом реабилитации после ЧМТ, однако оптимальные параметры стимуляции и механизмы действия не определены ввиду отсутствия доклинических исследований. Используя модель черепно-мозговой травмы у мышей, мы исследовали влияние анодной tDCS на церебральный кровоток и оксигенацию головного мозга и оценили эффективность стимуляции в восстановлении неврологических функций в зависимости от времени начала применения после травмы. ЧМТ вызывала поражение коры головного мозга и гиппокампа, снижение церебрального кровотока и гипоксию в области периконтузии и, как следствие, нарушение неврологических функций. Лазерная спекл-визуализация показала, что анодная tDCS вызывает увеличение регионального кровотока коры головного мозга. На микрососудистом уровне, используя *in vivo* двухфотонную лазерную сканирующую микроскопию, мы показали, что анодная tDCS вызывает дилатацию артериол, приводящую к увеличению капиллярного кровотока и оксигенации тканей. Четырехнедельный курс анодной tDCS значительно улучшал моторные и когнитивные неврологические показатели. Группа, в которой стимуляция начиналась через 3 недели после ЧМТ, продемонстрировала лучшее восстановление после травмы по сравнению с группой, в которой стимуляция начиналась через 1 неделю после ЧМТ, что указывает на то, что поздний посттравматический период является более оптимальным для применения анодной tDCS.

**Ключевые слова:** транскраниальная стимуляция постоянным током, вазодилатация, церебральный кровоток, черепно-мозговая травма.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-354-360

### Введение

Черепно-мозговые травмы (ЧМТ) представляют собой актуальную медицинскую проблему, так как являются одними из самых распространенных и опасных заболеваний головного мозга, которые вызывают хронические неврологические нарушения у выживших пациентов. В России около 700 тыс. человек получают ЧМТ каждый год, 50 тыс. из них становятся инвалидами [1]. Как правило, за первичной травмой следуют вторичные патофизиологические процессы, продолжающиеся в течение нескольких месяцев после травмы, что обеспечивает широкое терапевтическое окно для эффективного лечения и восстановления. К сожалению, на сегодняшний день эффективного метода терапии и реабилитации ЧМТ, подтверждённого клиническими исследованиями, не существует [2]. Транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) является многообещающим электротерапевтическим методом реабилитации, предложенным для лечения ЧМТ [3]. Однако отсутствие достаточного понимания механизмов действия и определённых оптимальных параметров стимуляции вследствие недостаточного количества доклинических исследований препятствует внедрению данного метода в практику. Считается, что в основе непосредственных эффектов tDCS лежит воздействие на возбудимость мембран нейронов [4]. В некоторых недавних работах было показано, что астроциты могут являться возможной первичной мишенью tDCS [5]. В других работах также было показано, что tDCS модулирует церебральный кровоток [6], однако механизмы изменения кровотока не известны. Как известно, снижение церебрального кровотока и наличие тканевой гипоксии являются распространёнными осложнениями после ЧМТ, и их улучшение способствует позитивной динамике улучшения после ЧМТ [7]. Мы предположили, что восстановление нарушенного после ЧМТ кровотока при применении tDCS может способствовать улучшению неврологических функций после ЧМТ.





В данном исследовании было изучено непосредственное влияние анодной tDCS на церебральную микроциркуляцию и оксигенацию тканей головного мозга мыши и определено оптимальное терапевтическое окно эффективного использования стимуляции с целью улучшения неврологических показателей у мышей с экспериментальной моделью черепно-мозговой травмы.

### Материалы и методы

#### Общий дизайн исследований

Протокол исследований был одобрен Комитетами по уходу и использованию лабораторных животных Саратовского государственного университета (протокол 7) и университета Нью-Мексико (№ 200247). Исследования были выполнены в соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных» [8] на 8 группах по 10 мышей в каждой: ЧМТ и без ЧМТ; с tDCS и без tDCS; через одну и три недели после травмы (таблица).

Метод tDCS, mA

Период после ЧМТ, неделя	Экспериментальные группы (10 мышей в группе)			
	Ложнооперированные	ЧМТ		
1	0	0,1	0	0,1
3	0	0,1	0	0,1

В качестве модели ЧМТ использовался метод контролируемого коркового повреждения головного мозга [9], которое наносилось при помощи стереотаксического импактора Benchmark (Leicabiosystems, Германия) с использованием плоского наконечника диаметром 3 мм, падающего со скоростью 5 м/с и глубиной проникновения 2,0 мм от поверхности коры, как описано в нашей предыдущей работе [10]. Ложнооперированные животные подвергались только краниотомии.

Мультисессионная анодная tDCS (0,1 mA / 15 мин) или ложная стимуляция (0 mA / 15 мин) начиналась через одну или три недели после ЧМТ и проводилась в течение 4 недель, при этом 4 последовательных дня стимуляции сменялись 3-дневными интервалами покоя. Анодный хлор-серебряный электрод диаметром 5 мм, смазанный токопроводящим гелем, размещали на коже непосредственно над краниотомией, катодный электрод на грудной клетке.

Тонус и кровоток микрососудов коры головного мозга, проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и оксигенация тканей (НАД-Н) измерялись до и после анодной tDCS с помощью *in vivo* 2-фотонного лазерного скани-

рующего микроскопа (2ФЛСМ); региональный кровоток с использованием *in vivo* лазерной спекл-визуализации (ЛСВ).

Для определения влияния курса tDCS на моторные и когнитивные функции мышей в раннем и позднем посттравматических периодах после ЧМТ неврологическое восстановление животных оценивали через одну неделю после окончания курса tDCS с помощью серии поведенческих тестов.

#### Лазерная спекл-визуализация

*In vivo* ЛСВ региональной перфузии коры головного мозга осуществлялась путем освещения черепа лазерным диодом длиной волны 785 нм и регистрацией отраженного света с длиной волны более 720 нм цифровой камерой как описано ранее [11]. Метод основан на эффекте беспорядочной интерференции, известной как спекл, происходящей при освещении объекта исследования лазерным светом. Движущиеся эритроциты изменяют интенсивность спеклов, предоставляя информацию о движении кровяных клеток в сосудах.

#### Двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия

ДФЛСМ осуществлялась с помощью системы Prairie View Ultima (Prairie Technologies, США), 10-ваттного диодного лазера накачки Millennium Prime (Spectra-Physics, США) и титан-сапфирового лазера двухфотонной эмиссии Tsunami (Spectra-Physics, США), настроенного на длину волны 750 нм, как описано в наших предыдущих работах [12]. Для исследования микроциркуляции 5% раствор флуоресцентного тетраметилпродамин-изотиоцианат-декстрана (TAMRA, 500 кДа) в физиологическом растворе был введен в кровоток через хвостовую вену до достижения конечной концентрации в крови 150 мкМ/л. Флуоресценция визуализировалась при помощи 20-кратного водно-иммерсионного объектива LUMPlan FL/IR 20X/0.5W (Olympus, Япония), отфильтровывалась оптическим фильтром с пропусканием 570–600 нм для TAMRA и 425–475 нм для НАД-Н и регистрировалась программой Prairie View. Все видимые микрососуды в объеме визуализации (500 × 500 × 300 мкм, XYZ) были отсканированы на каждом этапе исследования, скорость красных клеток крови (ККК) и диаметр каждого сосуда были измерены. При последующем анализе с использованием программы NIH ImageJ трехмерная анатомия сосудистой сети в интересующей нас области реконструировалась из Z-стеков плоских изображений и микрососуды были распределены по типам. Капилляры определялись как сосуды с диаметром от 3 до 8 мкм,



характерной извитостью и однопоточным расположением красных кровяных телец [13]. Пиальные, проникающие и прекапиллярные артериолы и венулы дифференцировались по морфологии и скорости потока эритроцитов и диаметру от 9 до 100 мкм [13].

Проницаемость ГЭБ оценивалась путём измерения динамики флуоресценции периваскулярной ткани головного мозга на уровне 50 мкм от пиальной поверхности в течение 15 мин после внутривенной инъекции 5% раствора TAMRA (150 кДа), как описано в предыдущих работах [12]. Флуоресценция 10 случайно выбранных сосудов и 10 регионов периваскулярной паренхимы мозга на каждом изображении была проанализирована при помощи программы ImageJ. Значения флуоресценции, полученные в интерстициальном пространстве, были нормализованы к максимальной интенсивности в кровеносных сосудах и выражены как процент интенсивности флуоресценции.

Тканевую гипоксию оценивали путем измерения аутофлуоресценции НАД-Н. Кофермент НАД-Н является первичным донором электронов в окислительном фосфорилировании в митохондриях клеток и его окислительно-восстановительное состояние отражает митохондриальную активность, которая зависит от насыщения тканей кислородом. Восстановленный НАД-Н является флуоресцентным с максимумом эмиссии 447 нм, в то время как окисленный НАД<sup>+</sup> нет, поэтому его флуоресценция НАД-Н является чувствительным индикатором насыщения клеток кислородом и может использоваться для оценки оксигенации ткани/уровня гипоксии [14].

#### *Поведенческое тестирование*

Тест «Ротарод» использовался для определения координации и моторного дефицита и был выполнен при помощи установки Ротарод, управляемой компьютером (San Diego Instruments, США). При этом автоматически регистрировалось время, проведенное животным на вращающемся роторе.

Методика условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) применялась для оценки способности животных к обучению, основанной на теории классического обусловливания И. П. Павлова. Выработка условного рефлекса избегания осуществлялась в камере Gemini Avoidance System, контролируемой программным обеспечением (San Diego Instruments, США). Камера состояла из двух сообщающихся отсеков – освещённого и тёмного, которые разделялись закрываемой заслонкой между ними. Мышь помещалась в светлый отсек и согласно

рефлекторному предпочтению перебегала в тёмный отсек, где подвергалась однократному шоку электрическим током (0,5 мА) длительностью пять секунд через металлическую решётку пола. На следующий день после тренировки мышь снова помещалась в освещённый отсек камеры, и регистрировалось латентное время перехода в темный отсек.

Тест «Y-образный лабиринт» применялся для измерения рабочей памяти и осуществлялся с использованием компьютерной системы (Noldus, EthoVision). В результате анализа было посчитано общее число выбранных рукавов и число спонтанных альтераций (т.е. случаев, где предыдущие два варианта выбранных рукавов отличались от третьего).

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, США). Для оценки статистической значимости полученных результатов использовались *t*-тест Стьюдента или тест Колмогорова–Смирнова, межгрупповые различия оценивались с помощью двухстороннего ANOVA. Уровень значимости был установлен  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

#### **Результаты и их обсуждение**

##### *Непосредственное влияние анодной tDCS на церебральный кровоток*

ЧМТ средней степени тяжести вызывала повреждение в тканях коры головного мозга и в подкорковых зонах, включая гиппокамп. Окраска по Ниссля показала нейродегенеративные изменения гиппокампа и теменной соматосенсорной коры с 18%-ной потерей нейронов по сравнению с контралатеральным полушарием.

Региональный церебральный кровоток в области периконтузии составлял  $48,8 \pm 8,8\%$  от базового уровня до стимуляции (рис. 1, а). Анодная tDCS увеличивала региональный церебральный кровоток билатерально в коре головного мозга у ложнопериоперированных мышей и мышей с ЧМТ (см. рис. 1, а,  $p < 0,05$ ).

При помощи двухфотонной микроскопии было выявлено, что ЧМТ вызывала спазм артериол, снижение микроциркуляции и тканевой оксигенации в периконтузионной зоне коры головного мозга (см. рис. 1, б–г). Анодная tDCS вызывала дилатацию артериол, сопровождаемую увеличением объёмного артериолярного кровотока (см. рис. 1, б,  $p < 0,01$ ), что, в свою очередь, способствовало увеличению скорости кровотока в капиллярах (см. рис. 1, в,  $p < 0,05$ ). Улучшенная перфузия в капиллярах после tDCS вызывала про-

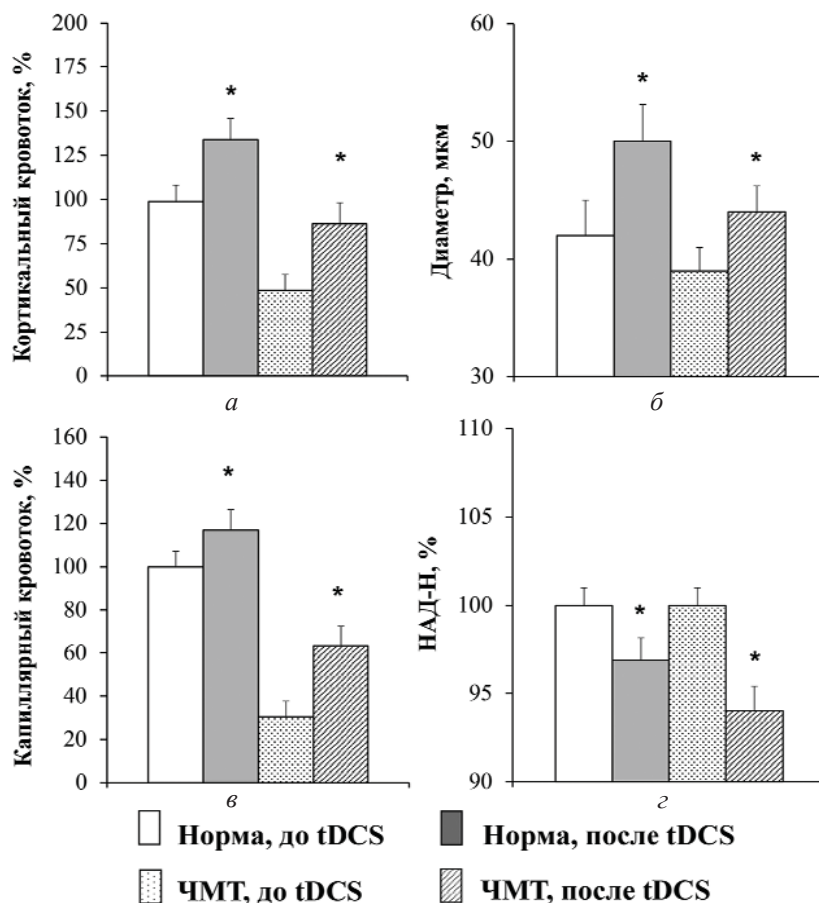


Рис. 1. Анодная tDCS улучшает церебральную микроциркуляцию и оксигенацию тканей головного мозга мыши: а – увеличение регионального церебрального кровотока; б – дилатация артериол; в – увеличение скорости эритроцитов в капиллярах; г – увеличение оксигенации тканей (снижение аутофлуоресценции НАДФ-Н). N = 10 для каждой группы, среднее арифметическое ± SEM, \*p < 0,05

должительное увеличение оксигенации тканей, отразившееся в уменьшении аутофлуоресценции НАДФ-Н в травмированном и нормальном мозге (см. рис. 1, г,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, анодная tDCS увеличивает церебральную микроциркуляцию и оксигенацию тканей вследствие дилатации артериол как у травмированных, так и у ложнооперированных мышей. Вазодилатация церебральных артериол после анодной tDCS может быть вызвана увеличенным синтезом оксида азота вследствие активации синтазы оксида азота (NOS), как показано в наших предыдущих работах на здоровом мозге крыс при воздействии импульсной стимуляции электромагнитным полем [15]. В дальнейших исследованиях следует определить, что является клеточной мишенью воздействия анодной tDCS и какая именно изоформа NOS (эндотелиальная или нейрональная) в первую очередь вызывает вазодилатацию вследствие стимуляции.

#### Влияние курса анодной tDCS

##### на неврологический статус мышей

Ухудшение церебрального кровотока и фокальная гипоксия тканей являются основными компонентами патофизиологии ЧМТ [16], поэтому увеличение мозгового кровотока может способствовать улучшению реабилитации в посттравматический период после ЧМТ.

В группе травмированных животных наблюдалось нарушение моторной функции и координации по сравнению с ложнооперированными животными, так как латентный период падения с вращающегося ротора (Ротарод) был существенно ниже (рис. 2, а). Мультибессеционный курс анодной tDCS значительно улучшал моторную функцию в стимулированной группе травмированных мышей, в которой стимуляция начиналась через 3 недели после ЧМТ; латентный период падения в стимулированной группе был более продолжительным, чем в группе с ложной стимуляцией (см. рис. 2, а,  $p < 0,05$ ).

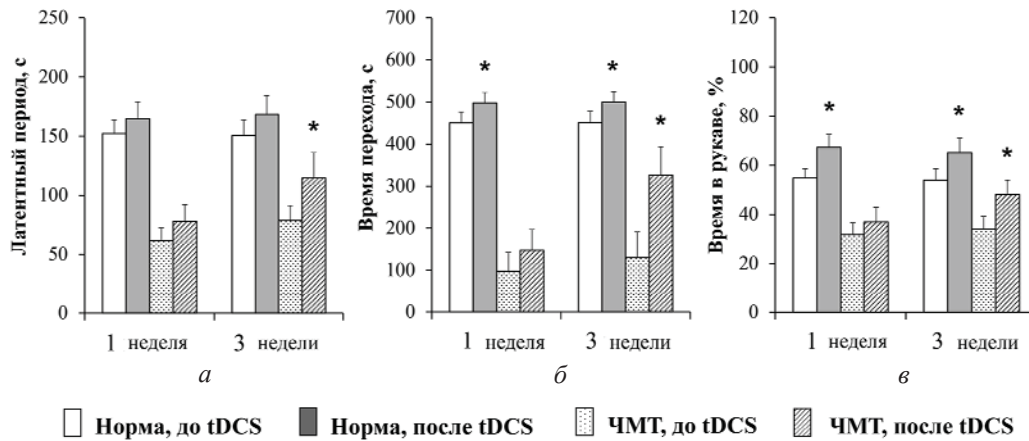


Рис. 2. Мультиセッションный курс анодной tDCS уменьшал неврологические нарушения, вызванные ЧМТ: *а* – тест Ротарод показал улучшение моторной функции и координации; *б* – методика УРПИ показала улучшение памяти и способности к обучению; *в* – тестирование в Y-образном лабиринте показало улучшение пространственной рабочей памяти.  $N = 10$  для каждой группы, среднее арифметическое  $\pm$  SEM,  $*p < 0,05$

Методика УРПИ выявила нарушение памяти и способности к обучению у травмированных мышей по сравнению с ложнооперированными (см. рис. 2, *б*). В стимулированной группе животных с ЧМТ, в которой стимуляция была начата через 3 недели после травмы, способности к обучению и память были лучше; латентное время перехода было значительно выше по сравнению с ложностимулированной группой (см. рис. 2, *б*,  $p < 0,01$ ). Следует отметить, что в группах ложнооперированных мышей в стимулированной группе также наблюдалось значительное улучшение когнитивных показателей в сравнении с ложностимулированной группой,  $p < 0,05$ .

Тестирование в Y-образном лабиринте показало, что ЧМТ нарушает пространственную рабочую память, так как мыши проводили одинаковое количество времени во всех трех рукавах (см. рис. 2, *в*). Мыши с ЧМТ, в которых стимуляция начиналась через 3 недели после травмы, чаще заходили в новый открытый рукав по сравнению с ложностимулированными мышами, что указывает на сохранение пространственной рабочей памяти в большей степени (см. рис. 2, *в*,  $p < 0,05$ ). В ложнооперированной группе анодная стимуляция также значительно улучшала пространственную рабочую память по сравнению с ложностимулированными мышами (см. рис. 2, *в*,  $p < 0,05$ ). Несмотря на то что мыши в группе с ЧМТ, в которой курс анодной tDCS был начат через одну неделю после травмы, показали более лучшие результаты, чем ложностимулированные, разница не была статистически значимой.

#### Влияние анодной tDCS на гематоэнцефалический барьер

Причина различия в динамике изменений неврологических показателей у мышей с ЧМТ в ранний и поздний посттравматические периоды осталась не выяснена, однако мы предположили, что в более ранний посттравматический период активно протекают патофизиологические процессы, включая перестройку церебральной сосудистой системы. Как известно, в стрессовых и постстрессовых состояниях гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), обеспечивающий разграничение кровяного русла и тканей мозга, становится более проницаемым и состояние его проницаемости может служить маркером стресса.

В ходе эксперимента было показано, что до стимуляции ГЭБ во всех группах был интактным: через 15 мин после инъекции флуоресценция составила  $9,8 \pm 1,2$ ,  $13,5 \pm 2,3$  и  $11,5 \pm 2,5\%$  в ложнооперированных, 1-недельной ЧМТ и 3-недельной ЧМТ группах соответственно. Однако после анодной tDCS в группе, в которой стимуляция была начата через одну неделю после травмы, флуоресценция увеличилась до  $55,2 \pm 18,1\%$ ,  $p < 0,01$ , что отражает усиление проницаемости ГЭБ. При этом в ложнооперированной группе и группе с началом стимуляции через 3 недели после ЧМТ ГЭБ оставался интактным:  $9,9 \pm 1,3$  и  $12,5 \pm 2,4\%$  соответственно.

Таким образом, поздний посттравматический период является более оптимальным для эффективного применения анодной tDCS, так как в группе мышей, в которой стимуляция началась через 3 недели после травмы, восстановление моторных и когнитивных функций про-

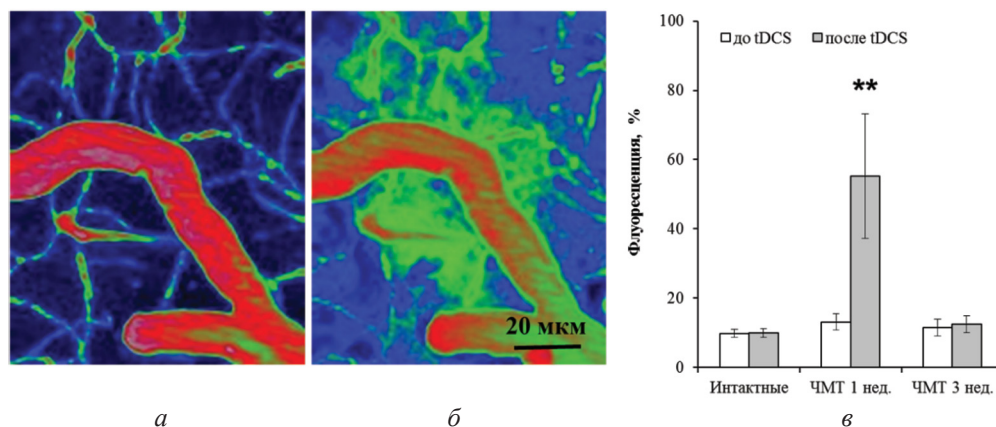


Рис. 3. Влияние tDCS на проницаемость гематоэнцефалического барьера: *а* – псевдоцветная микрофотография, показывающая яркие микрососуды, заполненные красителем и тёмную паренхиму головного мозга с интактным ГЭБ; *б* – та же область, со сниженной флуоресценцией в сосудах и увеличенной в приваскулярной паренхиме из-за экстравазации декстрана вследствие увеличения проницаемости ГЭБ; *в* – график, иллюстрирующий увеличение проницаемости ГЭБ в группе, в которой анодная стимуляция была начата через 1 неделю после ЧМТ; \*\* $p < 0,01$

ходило намного лучше, чем в группе, в которой стимуляция начиналась через 1 неделю после ЧМТ. Острые патофизиологические каскады, в том числе дисфункция гематоэнцефалического барьера и ауторегуляции церебрального кровотока, а также процессы регенерации, включая ангиогенез, которые все еще активны через одну неделю после ЧМТ [17], могут быть возможными причинами неэффективности анодной tDCS. Тогда как ГЭБ в ложнооперированном мозге и мозге в позднем посттравматическом периоде, где основные активные патологические изменения завершены, нечувствителен к воздействию tDCS. Вероятно, что в раннем посттравматическом периоде анодная стимуляция является дополнительным стрессом, вызывающим увеличение проницаемости ГЭБ, ведущую к усилению протекающих патофизиологических процессов и снижению позитивного эффекта стимуляции. Это подчеркивает важность определения терапевтического окна для эффективного и безопасного применения анодной tDCS.

### Заключение

Анодная tDCS увеличивает микроциркуляцию и оксигенацию тканей головного мозга вследствие дилатации артериол в нормальном и травмированном мозге мыши, что, в свою очередь, способствует улучшению неврологических показателей. Полученные результаты подчеркивают важность определения терапевтического окна для эффективного и безопасного применения анодной tDCS.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-75-20069) и National Institutes of Health / National Institute of General Medical Sciences (P20GM109089).

### Список литературы

1. *Потанов А. А., Лихтерман Л. Б.* Черепно-мозговая травма // Клиническая неврология : в 3 т. Основы нейрохирургии / под ред. А. Н. Коновалова. М. : Медицина, 2004. Т. 3 : в 2 ч. Ч. 1.
2. *Jain K. K.* Neuroprotection in traumatic brain injury // Drug Discovery Today. 2008. Vol. 13. P. 1082–1089.
3. *Clayton E., Kinley-Cooper S. K., Weber R. A., Adkins D. L.* Brain stimulation : Neuromodulation as a potential treatment for motor recovery following traumatic brain injury // Brain Res. 2016. Vol. 1640. P. 130–138.
4. *Nitsche M. A., Paulus W.* Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation // J. Physiol. 2000. Vol. 527, № 3. P. 633–639.
5. *Monai H., Ohkura M., Tanaka M., Konno Y., Oe A., Hirai H., Mikoshiba K., Itohara S., Nakai J., Iwai Y., Hirase H.* Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain // Nat. Commun. 2016. Vol. 7. P. 1–10.
6. *Wachter D., Wrede A., Schulz-Schaeffer W., Taghizadeh-Waghefi A., Nitsche M. A., Kutschenko A., Rohde V., Liebetanz D.* Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat // Exp. Neurol. 2011. Vol. 227, № 2. P. 322–327.
7. *Overgaard J., Tweed W. A.* Cerebral blood flow and its regulation after closed head injury with emphasis on clinical correlations // J. Neurosurg. 1974. Vol. 41. P. 531–541.
8. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, Na-



tional Research Council of the National Academies, Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington : The National Academies Press, 2011. URL: <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf> (accessed 28 February 2012).

9. Smith D. H., Soares H. D., Pierce J. S., Perlman K. G., Saatman K. E., Meaney D. F., Dixon C. E., McIntosh T. K. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse : cognitive and histopathologic effects // *J. Neurotrauma*. 1995. Vol. 12, № 2. P. 169–178.
10. Chohan M. O., Bragina O. A., Kazim S. F., Statom G. L., Baazaoui N., Bragin D. E., Iqbal K., Nemoto E. M., Yonas H. Enhancement of neurogenesis and memory by a neurotrophic peptide in mild to moderate traumatic brain injury // *Neurosurgery*. 2015. Vol. 76, № 2. P. 201–214.
11. Semyachkina–Glushkovskaya O. V., Bibikova O. A., Semyachkin–Glushkovskiy I. A., Sindeev S. S., Zinchenko E. M., Mohhanad M. K., Braun H. A., Al-Fatle F., Al Hassani L., Tuchin V. V. The assessment of pathological changes in cerebral blood flow in hypertensive rats with stress induced intracranial hemorrhage using Doppler OCT: Particularities of arterial and venous alterations // *Photonics & Lasers in Medicine*. 2013. Vol. 2, № 2. P. 109–116.
12. Bragin D. E., Kameneva M. V., Bragina O. A., Thomson S., Statom G. L., Lara D. A., Yang Y., Nemoto E. M. Rheological effects of drag-reducing polymers improve cerebral blood flow and oxygenation after traumatic brain injury in rats // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017. Vol. 37, № 3. P. 762–775.
13. Kleinfeld D., Mitra P. P., Helmchen F., Denk W. Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95, № 26. P. 15741–15746.
14. Chance B., Oshino N., Sugano T., Mayevsky A. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1973. Vol. 37. P. 277–292.
15. Bragin D. E., Statom G. L., Hagberg S., Nemoto E. M. Increases in microvascular perfusion and tissue oxygenation via pulsed electromagnetic fields in the healthy rat brain // *J. Neurosurg.* 2015. Vol. 122, № 5. P. 1239–1247.
16. Schroder M. L., Muizelaar J. P., Bullock M. R., Salvant J. B., Povlishock J. T. Focal ischemia due to traumatic contusions documented by stable xenon-CT and ultrastructural studies // *J. Neurosurg.* 1995. Vol. 82, № 6. P. 966–971.
17. Pop V., Badaut J. A neurovascular perspective for long-term changes after brain trauma // *Transl. Stroke Res.* 2011. Vol. 2, № 4. P. 533–545.

### **Anodal Transcranial Direct Current Stimulation Increases Cerebral Blood Flow, Tissue Oxygenation and Improves Neurological Functions in Intact Mice and in the Late Posttraumatic Period of Traumatic Brain Injury**

**O. A. Bragina, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya, D. E. Bragin**

Olga A. Bragina, ORCID 0000-0003-2810-9764, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, obragina@salud.unm.edu

Oxana V. Semyachkina-Glushkovskaya, ORCID 0000-0001-6753-7513, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

Denis E. Bragin, ORCID 0000-0003-4894-0061, Department of Neurosurgery, University of New Mexico School of Medicine, MSC 10 5615, NM, 87131, USA, dbragin@salud.unm.edu

Traumatic brain injury (TBI) is a major health problem that causes long term neurological deficit in the majority of patients and does not have any clinically proved effective treatment. Transcranial direct current stimulation (tDCS) is an emerging electroceutical therapy suggested for TBI rehabilitation. However, optimal parameters of stimulation and mechanisms of action are not determined due to lack of preclinical studies, impeding its clinical implementation. Using the mouse model of TBI, we investigated the effects of anodal tDCS on cerebral blood flow and tissue oxygenation and evaluated the time-dependent efficacy of tDCS in improvement of neurologic outcome. TBI caused damage to cerebral cortex and hippocampus, associated with a progressive decrease in cerebral blood flow and tissue oxygenation in the pericontusional area followed by neurological impairment. *In vivo* laser speckle imaging showed that anodal tDCS causes an increase in regional blood flow in the cerebral cortex. At the microvascular level, using *in vivo* two-photon laser scanning microscopy, we have shown that anodal tDCS causes dilatation of arterioles, leading to an increase in capillary blood flow and tissue oxygenation. The four-week course of anodal tDCS significantly improved motor and cognitive neurological functions. The group in which stimulation started 3 weeks after TBI showed a better recovery from injury than the group in which stimulation started 1 week after TBI, indicating that the late post-traumatic period is more optimal for the use of anodal tDCS.

**Key words:** transcranial direct current stimulation, vasodilation, cerebral blood flow, traumatic brain injury.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-75-20069) and National Institutes of Health / National Institute of General Medical Sciences (P20GM109089).

#### **Образец для цитирования:**

Брагина О. А., Семячкина-Глушковская О. В., Брагин Д. Е. Анодная транскраниальная стимуляция постоянным током увеличивает церебральный кровоток, оксигенацию тканей и снижает неврологические нарушения у мышей в норме и в позднем посттравматическом периоде черепно-мозговой травмы // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 354–360. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-354-360

#### **Cite this article as:**

Bragina O. A., Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Bragin D. E. Anodal Transcranial Direct Current Stimulation Increases Cerebral Blood Flow, Tissue Oxygenation and Improves Neurological Functions in Intact Mice and in the Late Posttraumatic Period of Traumatic Brain Injury. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 354–360 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-354-360



## ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.2

### ИНФОРМАЦИОННО-ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА ИНВЕНТАРИЗАЦИИ НУЖДАЮЩИХСЯ В ОХРАНЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

О. Н. Давиденко, С. А. Невский, Т. Н. Давиденко

Давиденко Ольга Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и экологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, alenka71980@mail.ru

Невский Сергей Александрович, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и экологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, nevskiysa@yandex.ru

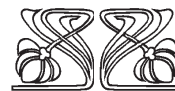
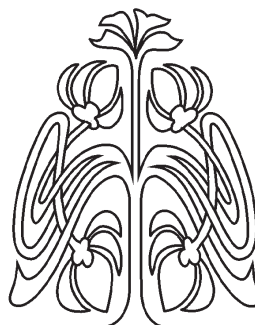
Давиденко Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и экологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, zlata-babochka2008@mail.ru

Инвентаризация нуждающихся в охране растительных сообществ – одно из направлений современных фитоценологических и экологических исследований. Важную роль в этом вопросе играет информационно-техническая поддержка. В статье приводятся сведения о структуре электронной базы данных «Растительные сообщества Саратовской области, нуждающиеся в охране». База данных состоит из пяти тематических блоков и охватывает информацию о синтаксономическом разнообразии сообществ, их фитоценологической характеристике, занимаемых местобитаниях, категориях и статусах редкости, мотивах и мерах охраны, современной обеспеченности охраной. База связана с рядом таблиц созданных ранее электронных баз «Растительный покров ООПТ Саратовской области» и «Охраняемые виды растений Саратовской области». Разработана методика описания нуждающихся в охране фитоценозов с учетом опыта подобной работы в других регионах. В настоящий момент база содержит полную информацию о 60 сообществах, которые могут быть отнесены к категории нуждающихся в охране на территории Саратовской области.

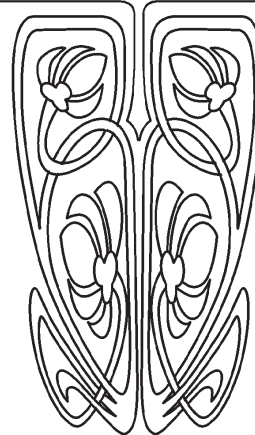
**Ключевые слова:** редкие растительные сообщества, база данных, Саратовская область, охрана природы.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-361-365

На территории Саратовской области с 2011 г. ведутся постоянные полевые исследования по выявлению растительных сообществ, нуждающихся в охране. Особое внимание уделяется фитоценозам с доминированием охраняемых видов растений и видов, новых для флоры Саратовской области. В 2014 г. разработан паспорт редкого растительного сообщества [1] с учетом имеющихся в литературе рекомендаций на этот счет [2–5]. К настоящему времени накоплен значительный фактический материал по характеристике растительных сообществ Саратовской области, нуждающихся в охране. Большой объем имеющихся данных и их разнонаправленный характер вызвали необходимость создания электронной базы для удобного хранения, обработки, сравнения и визуализации информации. Созданная база данных «Растительные сообщества Саратовской



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





области, нуждающиеся в охране» спроектирована в среде Microsoft Access и состоит из пяти блоков (рис. 1). Каждое сообщество имеет свой шифр, заключающий в себе тип растительности, к которому оно относится (степной, лесной, галофитной, кальцефитной, водной, луговой, болотной), категорию зональной, интразональной, экстразональной или азональной растительности и порядковый номер в группе. Фитоценотическая характеристика предполагает

стандартное описание сообщества с указанием основных фитоценологических параметров (число видов, общее проективное покрытие, ярусность, наличие охраняемых видов разных статусов). Названия видов растений приведены по сводке С. К. Черепанова [6]. Этот блок связан с вспомогательными таблицами по характеристике охраняемых видов растений (внесенных во второе издание Красной книги Саратовской области [7], внесенных в Красную книгу России [8]).



Рис. 1. Схема базы данных «Растительные сообщества Саратовской области, нуждающиеся в охране»

При необходимости по номеру описания можно просмотреть полный видовой состав сообщества, представленный в обобщенной вспомогательной таблице. Там же приведены сведения о конкретной точке описания, дате, степени антропогенной нагрузки. Эта же таблица служит основой для определения классификационного положения каждого сообщества. Обзор синтаксономического положения редкого

сообщества сразу по двум классификациям (эколого-фитоценологической и эколого-флористической) дает более полное представление о его месте в системе растительности. Однако заполнение этого пункта влечет за собой некоторые методические сложности, поскольку традиционно на территории Саратовской области преобладающая часть геоботанических исследований выполнена и выполняется до сих





пор в рамках эколого-фитоценотического подхода. Для большинства нуждающихся в охране сообществ нами проведен синтаксономический анализ методом Браун-Бланке [9], выделение и наименование новых ассоциаций – в соответствии с «Международным кодексом фитосоциологической номенклатуры» [10].

Отдельный блок в базе предусмотрен для хранения векторных карт распространения на

территории области каждого нуждающегося в охране сообщества. Для примера на рис. 2 приведена карта такого распространения для шаровницевого фитоценоза. Кроме того, для каждого сообщества приводятся характерные местообитания, типология которых предусматривает в обязательном порядке характеристику положения в рельефе и основные подтипы почв.

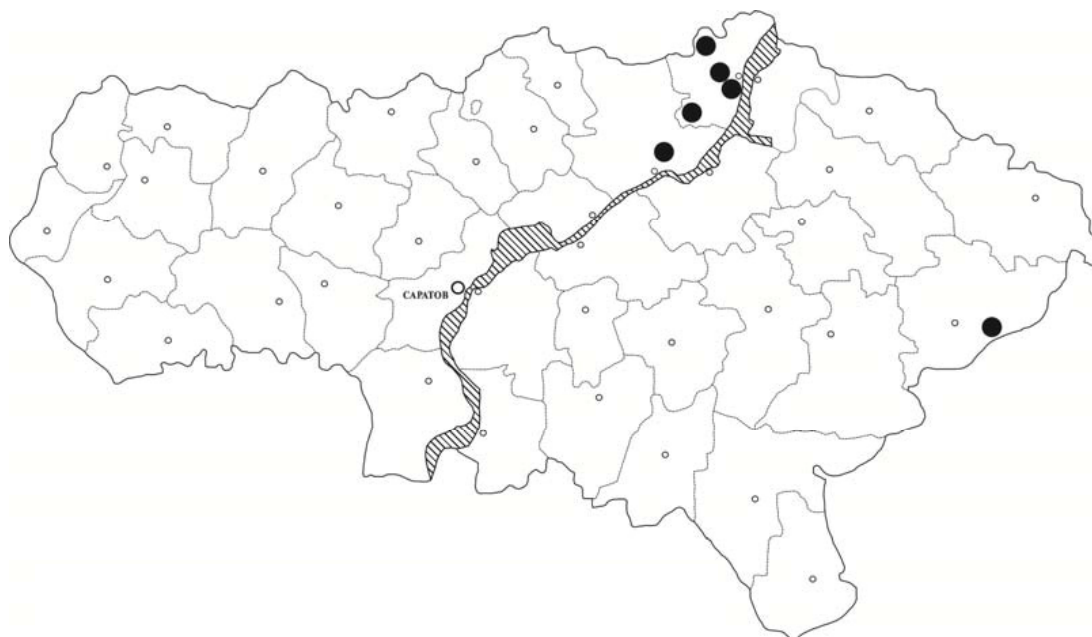


Рис. 2. Распространение шаровницевого фитоценоза в Саратовской области: ● – места конкретных описаний на территории области

Балльная оценка экспертных показателей (редкость, специальные характеристики сообщества, значение в природе и хозяйственной деятельности человека вместе с информацией о распространении сообществ) служит основой для следующего блока, объединяющего информацию о категориях редкости и природоохранном статусе сообществ. Нами приняты следующие категории редкости сообществ:

1 (E) – (exsertional) уникальные для области фитоценозы, известные из 1–2 точек, для сохранения которых целесообразна организация особо охраняемых природных территорий;

2 (R) – (rare plants communities) истинно редкие фитоценозы, известные для области из 3–5 точек;

3 (H) – (habitat of rare plants species) сообщества с участием охраняемых видов растений, которые проявляют верность именно этому фитоценозу, и сообщества с доминированием охраняемых видов растений;

4 (S) – (standart) фитоценозы, представляющие интерес в контексте эталонности для региона, с минимальными антропогенными нарушениями и сложной структурой.

Опираясь на опыт коллег по работе над Зеленой книгой Брянской области [11], для сообществ Саратовской области нами принята балльная шкала установления природоохранного статуса. В шкале экспертные показатели объединены в три раздела:

– редкость (R); максимальное количество баллов –  $12+x$  (где  $x$  – число отмеченных в сообществе охраняемых видов растений); здесь рассматриваются такие показатели, как распространение потенциально пригодных местообитаний, редкость ценозообразователя, присутствие охраняемых на региональном и федеральном уровнях видов и т.д.;

– специальные характеристики сообществ (G); максимальное количество баллов – 7; включают следующие параметры: экологическая



амплитуда сообщества, устойчивость к антропогенному воздействию, использование;

– значение сообществ в природе и хозяйственной деятельности человека (V); максимальное количество баллов – 8; учитывается средозащитное, рекреационно-культурное и научное значение сообществ.

Для каждого сообщества оценивается обеспеченность территориальной охраной: включено в режим ООПТ федерального значения; ведется региональная территориальная охрана в составе памятников природы; территориальная охрана отсутствует. Этот информационный раздел связан с основными таблицами созданной ранее электронной базы «Растительный покров ООПТ Саратовской области» [12]. Здесь же хранится информация о тех территориях, которые не входят в современную сеть ООПТ региона, но представляют несомненный интерес с точки зрения сохранения фиторазнообразия, поскольку там присутствуют сразу несколько редких растительных сообществ из разных типов растительности. По таким территориям в базе предусмотрены поля по синтаксономическому составу растительности, перечню охраняемых видов растений. Кроме того, есть возможность добавлять карты и фото этих территорий, перспективных для организации новых памятников природы Саратовской области.

Последний блок созданной электронной базы данных посвящен мотивам охраны и рекомендуемым мерам охраны (сохранение на территории памятников природы, контроль состояния сообществ, ограничение отдельных видов хозяйственной деятельности, изучение динамики состояния охраняемых видов и т.д.).

В настоящий момент база содержит полную информацию о 60 сообществах, которые могут быть отнесены к категории нуждающихся в охране на территории Саратовской области. Работа по инвентаризации редких сообществ продолжается.

### Благодарности

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-00747а).

### Список литературы

1. Давиденко О. Н., Невский С. А. К вопросу о паспортизации редких растительных сообществ Саратовской области // Аграр. науч. журн. 2014. № 3. С. 16–19.
2. Зеленая книга Самарской области : редкие и охраняемые растительные сообщества / под ред. Г. С. Розенберга, С. В. Саксонова. Самара : Самар. НЦ РАН, 2006. 201 с.
3. Зеленая книга Сибири : Редкие и нуждающиеся в охране растительные сообщества. Новосибирск : Наука. Сиб. изд. фирма РАН, 1996. 396 с.
4. Лысенко Т. М. К вопросу об охране растительных сообществ в Поволжье // Изв. СамНЦ РАН. 2010. Т. 12, № 1 (5). С. 1398–1400.
5. Лысенко Т. М. Растительность засоленных почв Поволжья в пределах лесостепной и степной зон. М. : Т-во науч. изд. КМК, 2016. 329 с.
6. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб. : Мир и семья, 1995. 992 с.
7. Красная книга Саратовской области. Саратов : Изд-во Торг.-пром. палаты Саратов. обл., 2006. 528 с.
8. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М. : Т-во науч. изд. КМК, 2008. 855 с.
9. Braun-Blanquet J. Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde. 3 Aufl. Wien ; N.Y. : Springer-Verlag, 1964. 865 S.
10. Вебер Х. Э., Моравец Я., Терий Ж.-П. Международный кодекс фитосоциологической номенклатуры // Растительность России. 2005. № 7. С. 3–38.
11. Зеленая книга Брянской области (растительные сообщества, нуждающиеся в охране / А. Д. Булохов, Ю. А. Семенищенков, Н. Н. Панасенко, Л. Н., Анищенко, Е. А. Аверинова, Ю. П. Федотов, А. В. Харин, А. А. Кузьменко, А. В. Шапурко. Брянск : ГУП «Брянск. обл. полигр. объединение», 2012. 144 с.
12. Давиденко О. Н., Невский С. А. О принципах организации электронной базы данных «Растительный покров ООПТ Саратовской области» // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 3. С. 58–63.

### Informational and Technical Support of Needing Protection Saratov Region Plant Communities Inventory

O. N. Davidenko, S. A. Nevskiy, T. N. Davidenko

Ol'ga N. Davidenko, ORCID 0000-0001-6112-2632, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, alenka71980@mail.ru

Sergej A. Nevskiy, ORCID 0000-0002-6522-2224, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, nevskiysa@yandex.ru

Tatyana N. Davidenko, ORCID 0000-0002-8484-8003, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, zlata-babochka2008@mail.ru

Inventory needing protection plant communities is one of the directions of modern phytocenosis and ecological research. The



information-technology support play the important role. This article provides information about the structure of electronic database "Needing protection plant communities of the Saratov region". The database consists of five thematic blocks and covers information about syntaksonomical diversity of communities, their phytocoenotic characterization, occupied habitat, categories and statuses rarity, reasons and measures of protection, modern security guards. Database is associated with a number of tables created earlier electronic databases "Vegetation of SPNT Saratov region" and "Protected plant species of the Saratov region". A method description communities

needing protection, taking into account the experience of similar work in other regions. At the moment the database contains full information about 60 communities that can be classified as in need of protection on the territory of the Saratov region.

**Key words:** rare plant communities, database, Saratov region, nature conservancy.

**Acknowledgements:** *This work was supported by the Russian Foundation for Basic Researches (project no. 16-04-00747a).*

---

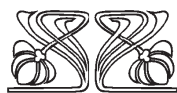
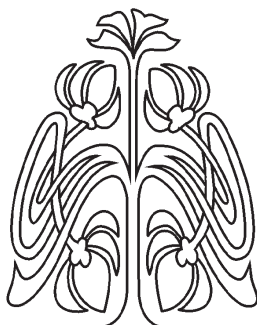
**Образец для цитирования:**

Давиденко О. Н., Невский С. А., Давиденко Т. Н. Информационно-техническая поддержка инвентаризации нуждающихся в охране растительных сообществ Саратовской области // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 361–365. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-361-365

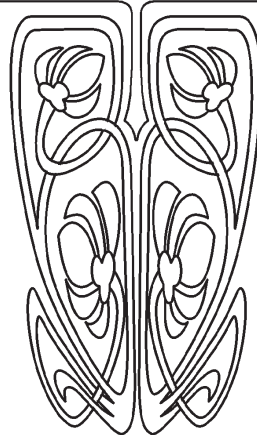
**Cite this article as:**

Davidenko O. N., Nevskiy S. A., Davidenko T. N. Informational and Technical Support of Needing Protection Saratov Region Plant Communities Inventory. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 361–365 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-361-365

---



**ПОДПИСКА**



**Подписка на I полугодие 2019 года**

Индекс издания в объединенном каталоге  
«Пресса России» 36012, раздел 30  
«Научно-технические издания.  
Известия РАН. Известия вузов»

Журнал выходит 4 раза в год

Цена свободная

Оформить подписку онлайн можно  
в интернет-каталоге «Пресса по подписке» ([www.akc.ru](http://www.akc.ru))

**Адрес издательства:**

410012, Саратов, Астраханская, 83;

**Тел.:** +7 (845-2) 51-45-49, 52-26-89

**Факс:** +7 (845-2) 27-85-29

**E-mail:** [izvestiya@sgu.ru](mailto:izvestiya@sgu.ru)

**Адрес редколлегии серии:**

410012, Саратов, Астраханская, 83,

СГУ имени Н. Г. Чернышевского,  
биологический факультет

**Тел./факс:** +7 (845-2) 22-51-38

**E-mail:** [ichbe-sgu@yandex.ru](mailto:ichbe-sgu@yandex.ru)

**Website:** <http://ichbe.sgu.ru>