

ISSN 1816-9775 (Print)
ISSN 2541-8971 (Online)

ИЗВЕСТИЯ САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Новая серия

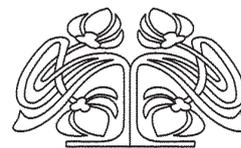


Серия Химия. Биология. Экология

2018

Том 18

Выпуск 4



СОДЕРЖАНИЕ

Научный отдел

Химия

- Бурчаков А. В., Гаркушин И. К., Милов С. Н.** Компьютерная модель фазового комплекса трехкомпонентной системы $\text{LiCl}-\text{Li}_2\text{MoO}_4-\text{Li}_2\text{WO}_4$ 370
- Смотров М. П., Уметчиков В. А., Данилина В. В., Черкасов Д. Г.** Фазовые равновесия и растворимость компонентов в двойной системе вода–дипропиламин 378
- Ермаков А. В., Вениг С. Б.** Перспективы развития биоподобных гибридных материалов на основе метода полиионной сборки 383
- Свешникова Е. С.** Получение нефтесорбентов из возобновляемого сельскохозяйственного сырья 390
- Кассим М. М., Горячева В. А., Аль-Алвани А. Ж., Глуховской Е. Г.** Влияние состава субфазы и внешних условий на формирование и свойства ленгмюровского монослоя 393

Биология

- Филиппчева Ю. А., Телешева Е. М., Евстигнеева С. С., Шелудько А. В., Пономарева Е. Г., Петрова Л. П., Кацы Е. И.** О вкладе агрегации клеток и экстраклеточной ДНК в формирование и стабилизацию биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* 399
- Севрюкова Г. А., Настинова Г. Э., Товмасын Л. А., Севрюкова П. Л.** Функциональное состояние системной гемодинамики российских и иностранных студентов на фоне ортостатической пробы 407
- Коробко В. В., Шевлягина О. Ф.** Влияние температуры культивирования на морфометрические и функциональные показатели роста *Triticum durum* L. 412
- Козырева Е. А., Болдырев В. А.** Эпифитные лишайники природного парка «Кумысная поляна» 419
- Семячкина-Глушковская О. В., Широков А. А., Наволокин Н. А., Терсков А. В., Бодрова А. А., Шушунова Н. А., Хороводов А. П., Уланова М. В., Агранович И. М., Искра Т. Д., Мамедова А. Т.** Оптимизация фотодинамических эффектов на проницаемость сосудов головного мозга 423
- Кармазина И. О., Шулаев Н. В.** Особенности фенологии прямокрылых (Insecta: Orthoptera) в условиях Волжско-Камского природного биосферного заповедника 429
- Дуарте Торрес Э. Н., Абдурашитов А. С., Намыкин А. А., Широков А. А., Шушунова Н. А., Саранцева Е. И., Семячкина-Глушковская О. В.** Роль менингеальной лимфатики в процессах очищения мозга: визуализация *in vivo* 433
- Селиверстова Е. Ю., Выростков В. А., Яровая Е. В., Куликов М. П., Дробот В. Ю., Сазыкин И. С., Сазыкина М. А.** Влияние загрязняющих веществ на возникновение устойчивости к рифампицину у бактерий рода *Pseudomonas* 439
- Хороводов А. П., Широков А. А., Новолокин Н. А., Терсков А. В., Лаубертс Э. А., Мамедова А. Т., Шушунова Н. А., Агранович И. М., Уланова М. В., Бодрова А. А., Семячкина-Глушковская О. В.** Развитие флуоресцентной глиомы у крыс в условиях фармакологической модуляции бета2-адренорецепторов 446
- Кирилова А. В., Глинская Е. В., Воронин М. Ю., Савельева А. С.** Бактериообращения в системе технического водоснабжения Балаковской атомной электростанции 451
- Шугова В. В., Русяева А. Б.** Получение и оценка молекулярных свойств альгината, синтезированного при культивировании *Azotobacter vinelandii* Д-05 455
- Плугатарь Ю. В., Сахно Т. М.** Биометрические характеристики и аэродинамические свойства пыльцевых зерен североамериканских сосен в условиях Южного берега Крыма 462
- Ильина Н. А., Ксенофонтова О. Ю., Третьякова С. Э., Тихомирова Е. И.** Разработка схемы усиления деструктивного потенциала аборигенного штамма *Pseudomonas putida* SU12, выделенного из почв, загрязненных фенольными соединениями 469
- Терин Д. В., Браташов Д. Н., Ревзина Е. М., Роках Г. Е.** Исследование взаимодействия наночастиц кремния с клетками HeLa 473

Экология

- Золотухин В. В., Аникин В. В.** Продвижение грушевой плодовой гнили *Cydia pyrivora* (Lepidoptera: Tortricidae) на северо-востоке европейской части России 476
- Мельников Е. Ю., Гавриленко В. С.** Пространственная структура колонии и особенности гнездования обыкновенного скворца (*Sturnus vulgaris*) и полевого воробья (*Passer montanus*) в зеленой зоне г. Энгельса 480

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 30.11.18.

Формат 60×84 1/8.

Усл. печ. л. 13,95 (15,0).

Тираж 500 экз. Заказ 162-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; 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

Burchakov A. V., Garkushin I. K., Milov S. N. Computer Model of Phase Complex of Ternary System $\text{LiCl}-\text{Li}_2\text{MoO}_4-\text{Li}_2\text{WO}_4$. 370

Smotrov M. P., Umetchikov V. A., Danilina V. V., Cherkasov D. G. Phase Equilibria and Component Solubility in the Binary System *Water+Dipropylamine* 378

Ermakov A. V., Venig S. B. Prospects for the Development of Biomimetic Hybrid Materials Based on the Layer-by-Layer Assembly Technique 383

Sveshnikova E. S. Receiving Oil Sorbents from Renewable Agricultural Raw Materials 390

Qassime M. M., Goryacheva V. A., Al-Alwani A. J., Glukhovskoy E. G. The Influence of the Composition of Subphase and External Conditions on the Formation and Properties of Langmuir Monolayer 393

Biology

Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Yevstigneyeva S. S., Shelud'ko A. V., Ponomareva E. G., Petrova L. P., Katsy E. I. On the Contribution of Cell Aggregation and Extracellular DNA to Biofilm Formation and Stabilization in *Azospirillum brasilense* Bacteria 399

Sevriukova G. A., Nastinova G. E., Tovmasian L. A., Sevriukova P. L. The Functional State of Systemic Hemodynamics Russian and Foreign Students at Orthostasis 407

Korobko V. V., Shevlyagina O. F. Influence of the Cultivation Temperature on Morphometric and Functional Indices of Growth *Triticum durum* L. 412

Kozyreva E. A., Boldyrev V. A. Epiphytic Lichens of Natural Park "Kumysnaya Polyana" 419

Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Shirokov A. A., Navolokin N. A., Terskov A. V., Bodrova A. A., Shushunova N. A., Khorovodov A. P., Ulanova M. V., Agranovich I. M., Iskra T. D., Mamedova A. T. Optimization of Photodynamic Effects on Permeability of Cerebral Vessels 423

Karmazina I. O., Shulaev N. V. Phenological Characteristics of Orthopteran Insects (Orthoptera) in the Volga-Kama State Nature Biosphere Reserve 429

Duarte Torres E. N., Abdurashitov A. S., Namykin A. A., Shirokov A. A., Shushunova N. A., Sarantseva E. I., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Lymphatic Meningeal Role in Processes of Brain Clearing: *in vivo* Visualization 433

Seliverstova E. Yu., Vyrostkov V. A., Yarovaya E. V., Kulikov M. P., Drobot V. Yu., Sazykin I. S., Sazykina M. A. The Effect of Pollutants on the Emergence of Rifampicin Resistance in Bacteria of the *Pseudomonas* Genus 439

Khorovodov A. P., Shirokov A. A., Navolokin N. A., Terskov A. V., Lauberts E. A., Mamedova A. T., Shushunova N. A., Agranovich I. M., Ulanova M. V., Bodrova A. A., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Development of Fluorescent Glioma in Rats under Pharmacological Modulation of Beta2-Adrenergic Receptor 446

Kirilova A. V., Glinskaya E. V., Voronin M. Yu., Saveleva A. S. Bacteria Fouling in the Systems of Technical and Circulating Water Supply of Balakovo Nuclear Power Station 451

Shutova V. V., Rusyaeva A. B. Preparation and Identification of the Molecular Properties of Alginate Synthesized by the Cultivation of *Azotobacter vinelandii* D-05 455

Plugatar Yu. V., Sakhno T. M. Biometric Characteristics and Aerodynamic Properties of Pollen Grains of North American Pines under Conditions of the Southern Coast of the Crimea 462

Ilyina N. A., Ksenofontova O. Yu., Tretyakova S. E., Tikhomirova E. I. Developing the Algorithm of Increasing the Destructive Potential of *Pseudomonas putida* SU12 Native Strain Extracted From Phenol-Contaminated Soils 469

Terin D. V., Bratashov D. N., Revzina E. M., Rokakh G. E. Investigation of Interaction Between Silicon-Based Nanoparticles and HeLa Cells 473

Ecology

Zolotuhin V. V., Anikin V. V. The Spreading of Pear Moth – *Cydia pyrivora* (Lepidoptera: Tortricidae) on the North-East of the European Part of Russia 476

Melnikov E. Yu., Gavrilenko V. S. Structure of Colonies and Nesting Peculiarities of Common Starling (*Sturnus vulgaris*) and Tree Sparrow (*Passer montanus*) in Green Zone of Engels City 480



**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)

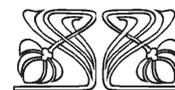
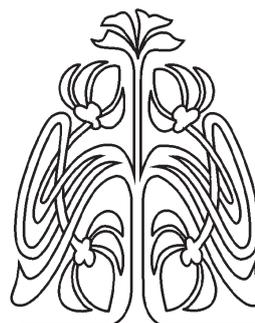
Deputy Editor-in-Chief – Olga V. Fedotova (Saratov, Russia)

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

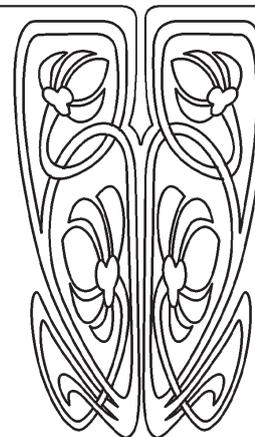
Members of the Editorial Board:

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 544.016.2

КОМПЬЮТЕРНАЯ МОДЕЛЬ ФАЗОВОГО КОМПЛЕКСА ТРЕХКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЫ $\text{LiCl}-\text{Li}_2\text{MoO}_4-\text{Li}_2\text{WO}_4$

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

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

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

Милов Сергей Николаевич, соискатель кафедры общей и неорганической химии, Самарский государственный технический университет, milov_sergei@mail.ru

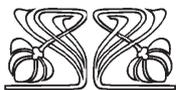
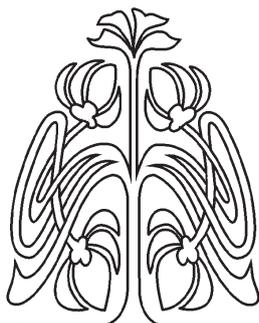
Решение теоретических и практических задач на основе фазовых равновесий в многокомпонентных системах (МКС) является основой материаловедения: синтеза металлов, сплавов, полупроводников и многих других веществ и смесей. В общем случае первым этапом исследования фазовых диаграмм является их расчет различными методами. Однако современное состояние теории не позволяет рассчитывать фазовые диаграммы достаточно точно и корректно даже для двухкомпонентных систем. В то же время экспериментальное изучение фазовых равновесий позволяет получить наиболее достоверную и полную информацию о свойствах систем. Но это достигается ценой значительных материальных и временных затрат. По мере увеличения числа компонентов изучаемых систем эти затраты многократно возрастают. Широко применяемые в последнее время методы планирования эксперимента не позволяют существенно уменьшить объем экспериментальных исследований многокомпонентных систем. Применение же различных типов моделей фазовых систем дает возможность упростить их исследование. В настоящей работе проведено теоретическое изучение фазового комплекса трехкомпонентной системы $\text{LiCl}-\text{Li}_2\text{MoO}_4-\text{Li}_2\text{WO}_4$ с помощью 3D-моделирования в программе-редакторе КОМПАС-3D. Осуществлено построение точек невариантных равновесных состояний, линий моновариантных равновесий и поверхностей дивариантных равновесий в пространстве модели по точкам, полученным экспериментально при изучении элементов ограничения. Результаты анализа модели – изотермические и политермические сечения, диаграмма материального баланса. Модель дает возможность осуществить прогноз температуры и последовательность кристаллизующихся фаз для смеси с произвольным соотношением компонентов системы.

Ключевые слова: фазовые равновесия, треугольник составов, компьютерная модель, базовые геометрические элементы модели, ликвидус, молибдат, вольфрамат, хлорид лития, T - x - y -фазовая диаграмма, фазовый комплекс системы, минимум, непрерывный ряд твердых растворов.

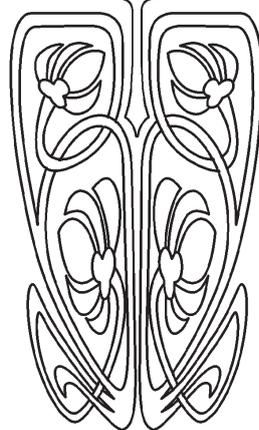
DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-370-377>

Введение

Ионные солевые расплавы применяются в качестве теплоносителей и флюсов, при гальванопокрытии и рафинировании сплавов, очистке от окислы поверхности предварительно термически обработанных изделий и т.д. Существенное значение имеют солевые расплавы в таких важных технологических процессах, как литье легких и цветных металлов и сплавов, электродуговая и электрошлаковая



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





сварка (переплав), выращивание монокристаллов оптических материалов и сегнетоэлектриков, осуществление неорганического синтеза [1–9].

Основой приведенных выше технологических процессов являются сведения о равновесных составах и диаграммах состояния систем из химических веществ, участвующих в физико-химических превращениях в заданных условиях. Получить такие сведения возможно двумя путями: экспериментальными методами либо с помощью термодинамического моделирования. Экспериментальные методы чрезвычайно трудоемки и требуют больших временных затрат для их проведения и интерпретации (особенно для многокомпонентных систем). В связи с этим методы термодинамического моделирования предпочтительнее при условии контроля расчетных результатов экспериментом [10–19].

Цель работы: конструирование компьютерной трехмерной модели фазового комплекса трехкомпонентной системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ в среде КОМПАС-3D на основании экспериментальных данных элементов ограничения. Провести анализ модели, выполнить построение изотермических и политермических сечений, построить диаграмму материального баланса равновесных фаз.

Материалы и методы

На основании полученных экспериментальных данных о системе (табл. 1) в среде КОМПАС-3D сконструирована компьютерная трехмерная модель фазового комплекса в виде T - x - y -фазовой диаграммы [20–23] (рис. 1).

Данные о точках ликвидуса систем $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4$ и $\text{LiCl-Li}_2\text{WO}_4$

$(\text{LiCl})_2\text{-Li}_2\text{MoO}_4$		$(\text{LiCl})_2\text{-Li}_2\text{WO}_4$	
% экв. Li_2MoO_4	$t, ^\circ\text{C}$	% экв. Li_2WO_4	$t, ^\circ\text{C}$
0,0	610	0	610
5,0	596	5,0	597
25,0	550	25,0	543
40,0	503	40,0	498
42,0*	495	41,0*	496
45,0	504	42,5	500
50,0	518	50,0	537
57,5	537	65,0	592
58,5	540	77,5	618
62,5	567	80,0	620
70,0	605	82,5	637
80,0	647	90,0	686
95,0	695	97,5	725
100,0	702	100,0	740

Примечание. * отмечены содержание компонентов и температуры плавления двойных эвтектик.

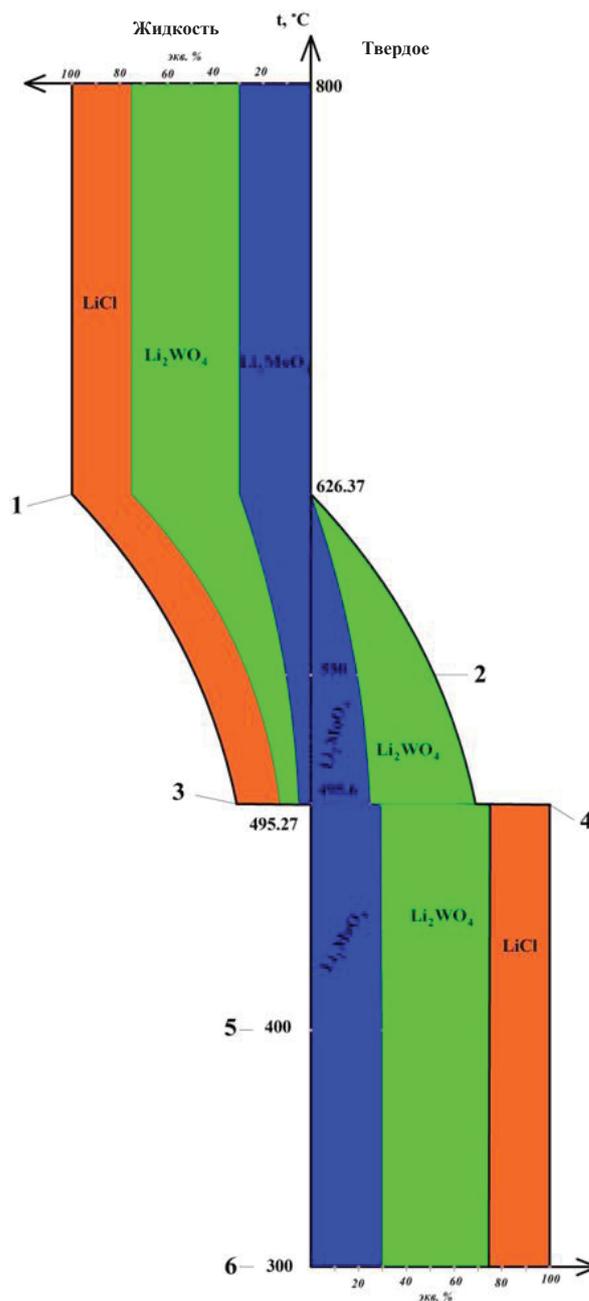


Рис. 1. Диаграмма материального баланса равновесных фаз для смеси x (25 экв.% LiCl + 30 экв.% Li_2MoO_4 + 45 экв.% Li_2WO_4)

Построение модели фазового комплекса состоит из следующих этапов.

1. Обзор литературы и при необходимости экспериментальное исследование элементов ограничения системы и фазовых равновесий в самой системе.

Для трехкомпонентной системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ имеются экспериментальные данные по температурам линий ликвидуса ограничивающих двухкомпонентных эвтектических



систем $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4$ и $\text{LiCl-Li}_2\text{WO}_4$, а также координаты двойных эвтектик (см. табл. 1) [24–27]. В системе $\text{Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ отмечено образование непрерывного ряда твердых растворов без минимума [24]. Поэтому в системе $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ будут отсутствовать инвариантные точки, продуктами кристаллизации будут соответственно фазы: фаза непрерывного ряда твердых растворов на основе пары солей Li_2MoO_4 и Li_2WO_4 и твердая фаза LiCl . Имеющихся данных по системам ограничения

достаточно для построения 3D-модели системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$.

2. Определение базовых геометрических элементов модели на основании фазовых областей, характеризующих фазовый комплекс системы [20].

При составлении табл. 2 было учтено одно положение, что в системе твердые фазы хлорида лития LiCl и непрерывный ряд твердых растворов на основе пары солей Li_2MoO_4 и Li_2WO_4 ($\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4$) отсутствуют области гомогенности.

Таблица 2

Базовые геометрические элементы модели системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$

Фазовая область	Φ	C	Тип равновесия	Геометрический элемент
Ж+LiCl	2	2	Бивариантный	Одна поверхность ($\text{LiCl-e 496-e 495-LiCl}$)
$\text{Ж+Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4$	2	2	Бивариантный	Одна поверхность ($\text{e 496-e 495-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4\text{-e 496}$)
$\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4 + \text{LiCl}$	2	2	Бивариантный	Поверхности вырождены
$\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4 + \text{LiCl} + \text{Ж}$	3	1	Моновариантный	Одна линия e 496-e 495

3. Перерасчет координат инвариантных точек из координат состава и температуры в координаты декартовой системы [20].

Для перерасчета координат использовалось следующее матричное уравнение (1):

$$(x_i \ y_i \ z_i \ 1) = (b_i \ c_i \ t_i \ 1) \times \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ -\frac{100}{3} & -\frac{100}{3} & -\frac{T_B-T_H}{2} & 1 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0,5 & \frac{\sqrt{3}}{2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k & 0 \\ 0 & 0 & -kT_H & 1 \end{pmatrix}. \quad (1)$$

Здесь x_i, y_i, z_i – координаты фигуративной точки I – координаты декартовой системы координат; a_i ($a_i=100 - b_i - c_i$), b_i, c_i – содержание компонентов LiCl , Li_2MoO_4 и Li_2WO_4 (в эквивалентных процентах) сплава точки – барицентрические координаты состава точки; T_i – температура состава сплава, отвечающего фигуративной точке I , K ; T_H – задаваемая температура (кратная 100), ниже по значению минимальной температуры изучаемого фазового превращения в системе;

$$k = \frac{h}{T_B - T_H};$$

k – нормирующий температурный коэффициент моделирования, необходим для создания модели диаграммы с высотой по температуре, равной h ед. Обычно $h = 100$ ед.

$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ -\frac{100}{3} & -\frac{100}{3} & -\frac{T_B-T_H}{2} & 1 \end{pmatrix}$ – матрица параллельного переноса начала координат в центр фигуры треугольной призмы.

4. Построение ограничивающих элементов (точек и линий) в объеме модели;

Для этого используются данные табл. 1.

5. Построение базовых и дополнительных геометрических элементов модели.

Базовые геометрические элементы модели (см. табл. 2) характеризуют геометрическое строение фазовых областей. На рис. 2 изображена модель с построенными геометрическими элементами, которые отмечены в табл. 1.

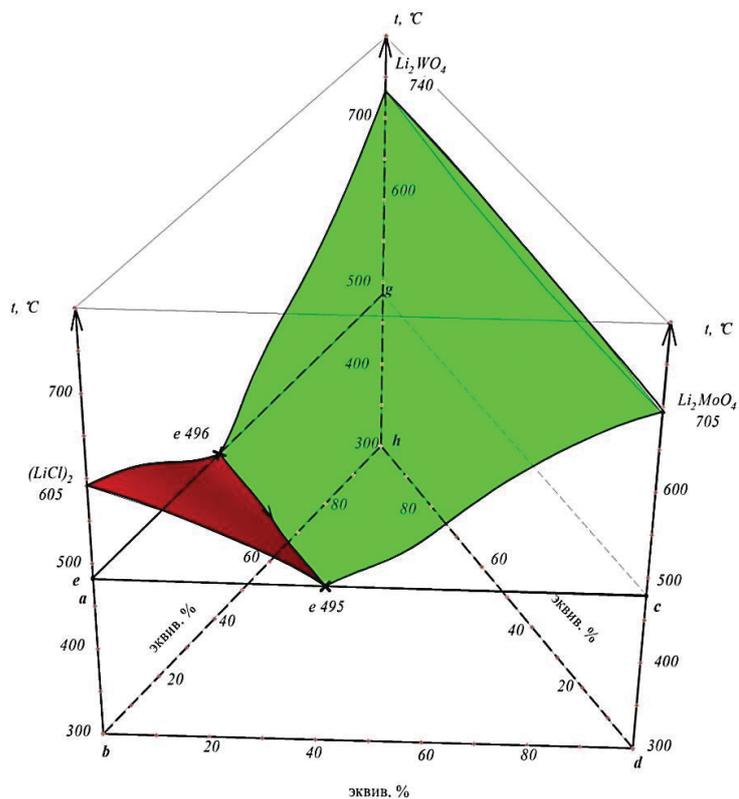


Рис. 2. Базовые геометрические элементы модели системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$

Для того чтобы ограничить объемы фазовых областей, необходимы дополнительные геометрические элементы – линейчатые поверхности

для трехфазной области сосуществования жидкости, LiCl и $\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4$. Таким образом, имеем полный вид 3D модели (рис. 3).

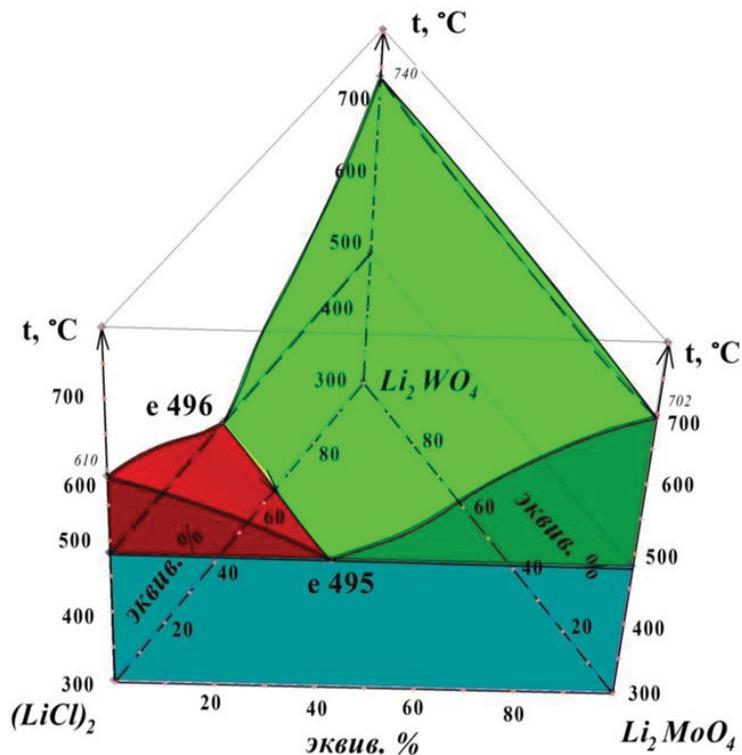


Рис. 3. 3D-модель фазового комплекса системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$



6. Анализ геометрической модели: построение политермических и изотермических сечений, изотерм поверхности ликвидуса, расчет материального баланса равновесных фаз системы (рис. 4, 5) [20].

Результаты и их обсуждение

Трехмерная модель, выполненная в программе КОМПАС-3D [28], дает возможность построить изотермические сечения системы для любого значения температуры в выбранном диапазоне (300–800 °С). Анализ сечений на рис. 4 показывает, что при понижении температуры в системе уменьшается область жидкости и увеличиваются области сосуществования жидкости и твердой фазы. При температуре ниже 495 °С исчезает жидкая фаза.

Если изотермические сечения получают в результате выявления линий пересечения горизонтальной плоскости со строго заданной

координатой z с поверхностями модели, то политермические сечения строятся на основе пересечения вертикальной плоскости с поверхностями модели (рис. 5). И в том, и в другом случае получаемые линии характеризуют границы фазовых областей.

Для некоторой смеси x с составом 25 экв.% LiCl + 30 экв.% Li_2MoO_4 + 45 экв.% Li_2WO_4 проведен расчет равновесных фаз в диапазоне температур 300–800 °С (рис. 5). При температуре 626 °С начинается первичная кристаллизация твердого раствора $\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4$, при температуре 496 °С совместно кристаллизуются непрерывный ряд твердых растворов $\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4$ и твердая фаза LiCl , а при температуре 495 °С жидкая фаза пропадает, в системе остаются две твердые фазы $\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4$ и LiCl . Ниже 495 °С в системе происходит перераспределение компонентов между твердым раствором $\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4$ и LiCl .

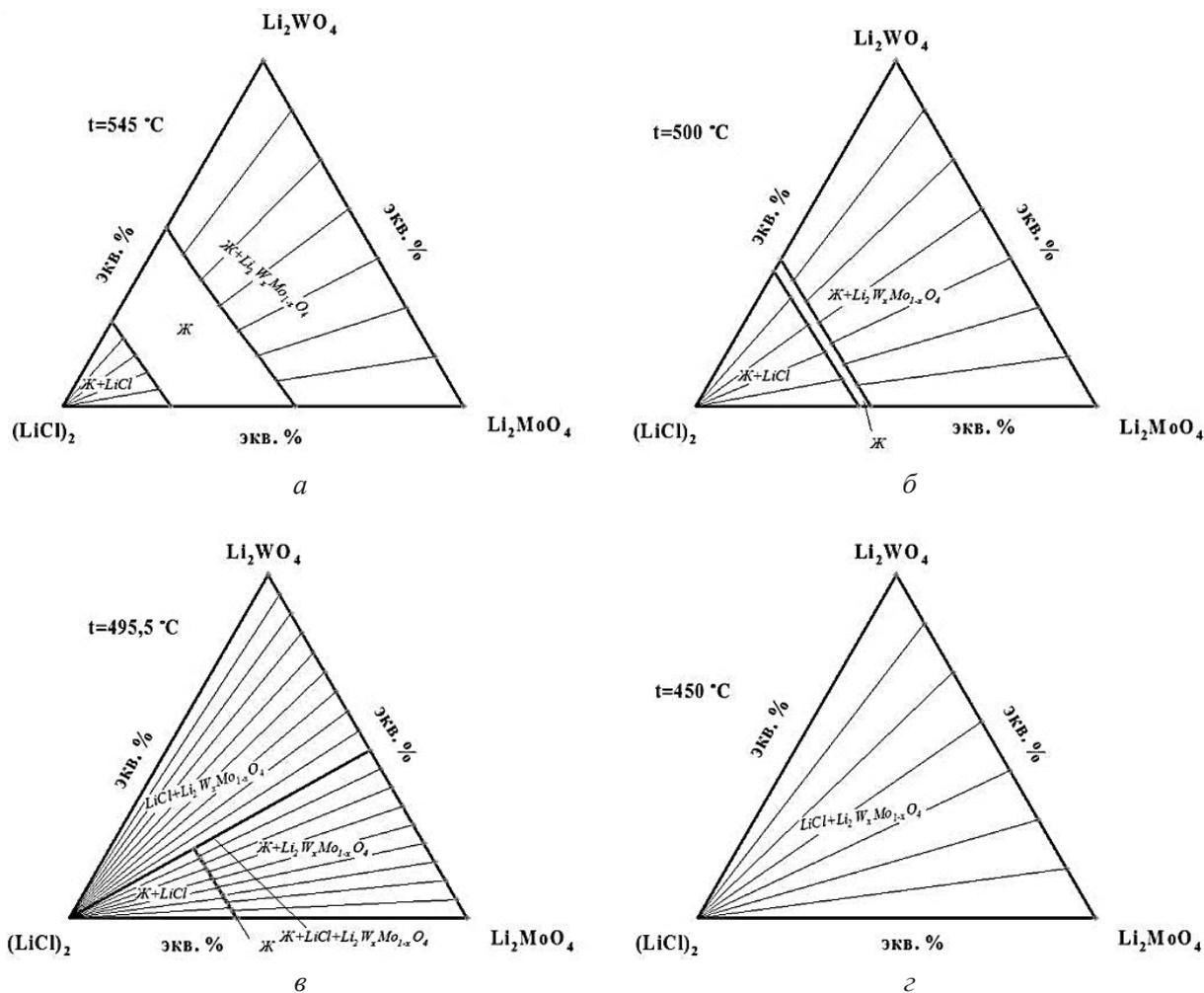


Рис. 4. Изотермические сечения системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ при t °С: а – 545; б – 500; в – 495,5; г – 450

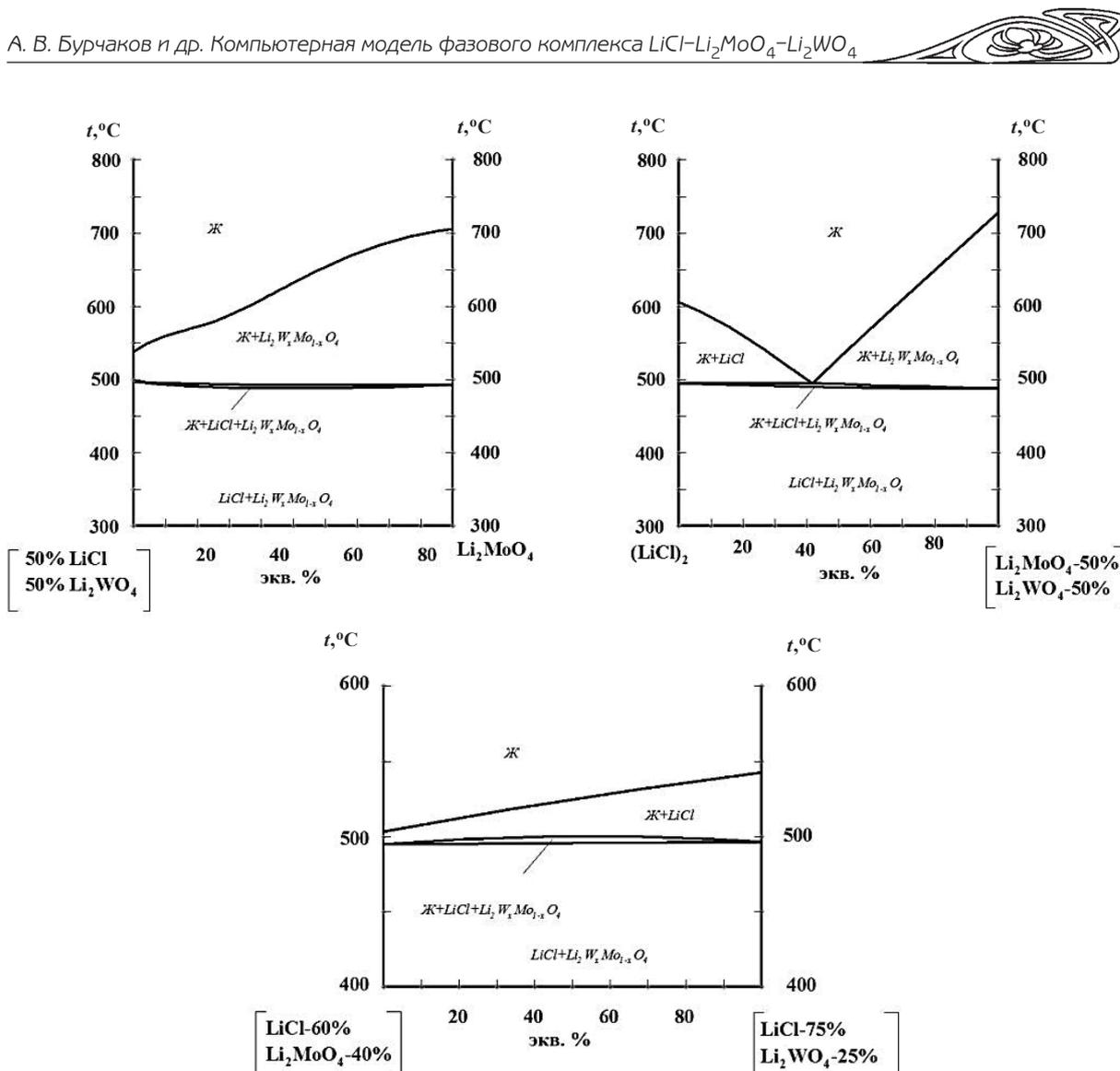


Рис. 5. Политермические сечения системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$

Выводы

1. В системе кристаллизуются две фазы: фаза непрерывного ряда твердого раствора $\text{Li}_2\text{W}_x\text{Mo}_{1-x}\text{O}_4$ и фаза хлорида лития LiCl .

2. Определены базовые геометрические элементы модели, необходимые для построения 3D-модели.

3. В работе по экспериментальным данным элементов ограничения $(\text{LiCl})_2\text{-Li}_2\text{MoO}_4$ и $(\text{LiCl})_2\text{-Li}_2\text{WO}_4$ тройной системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ проведено построение 3D-модели фазового комплекса системы.

4. На базе 3D-модели фазового комплекса системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ построены изотермические и политермические сечения системы, проведен расчет равновесных фаз в заданном диапазоне температур 300–800 °С.

Благодарности

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

Список литературы

1. Гуревич С. М. Флюсы для электросварки титана // Автоматическая сварка. 1958. № 10. С. 3–13.
2. Лашко С. В., Павлов В. И., Парамонова В. П. Экзотермическая пайка (сварка) проводов в расплавленных галогенидах // Сварочное производство. 1973. № 5. С. 38–39.
3. Делимарский Ю. К. Химия ионных расплавов. Киев : Наук. думка, 1980. 327 с.
4. Лидоренко Н., Мучник Г., Трушевский С. Аккумуляция плавлением // Наука и жизнь. 1974. Вып. 3. С. 19–21.



5. Багоцкий В. С., Скундин А. М. Химические источники тока. М. : Энергоиздат, 1981. 360 с.
6. Делимарский Ю. К., Барчук Л. П. Прикладная химия ионных расплавов. Киев : Наук. думка, 1988. 192 с.
7. Варыпаев Н. Н. Химические источники тока : учеб. пособие для хим.-технол. спец. вузов. М. : Высш. шк., 1990. 240 с.
8. Соболева Л. В. Выращивание новых функциональных монокристаллов. М. : ФИЗМАТЛИТ, 2009. 248 с.
9. Намиас М. Ядерная энергия. М. : Изд-во иностр. лит., 1955. 206 с.
10. Смородинов В. С., Оскорбин Н. М. Математическое моделирование диаграмм плавкости двухкомпонентных солевых систем с твердыми растворами непрерывного ряда // Изв. Алт. гос. ун-та. 2010. № 3–2. С. 164–168.
11. Удалов Ю. П. Применение программных комплексов вычислительной и геометрической термодинамики в проектировании технологических процессов неорганических веществ : учеб. пособие. СПб. : СПбГТИ(ТУ), 2012. 147 с.
12. Keke Chang, Shuhong Liu, Dongdong Zhao, Yong Du, Liangcai Zhou, Li Chen. Thermodynamic description of the Al–Cu–Mg–Mn–Si quinary system and its application to solidification simulation // *Thermochimica Acta*. 2011. № 512. P. 258–267.
13. Xueli Huang, Pengsheng Song, Lijuan Chenb, Bingling Lu. Liquid–solid equilibria in quinary system $\text{Na}^+, \text{Mg}^{2+}/\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}, \text{NO}_3^- - \text{H}_2\text{O}$ at 298.15 K // *Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry*. 2008. № 32. P. 188–194.
14. Kanghou Zhang, Yun Xu. An investigation of the Pd–Ag–Ru–Gd quaternary system phase diagram // *J. of Alloys and Compounds*. 2005. № 400. P. 131–135.
15. Huang Xueli, Li Songwan. Liquid-solid Equilibria in Quinary System $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}/\text{Cl}^-, \text{NO}_3^- - \text{H}_2\text{O}$ at 25 °C // *Chin. J. of Chem. Engineer*. 2011. Vol. 19, № 1. P. 101–107.
16. Buchelnikov V., Sokolovskiy V., Taskaev S., Taranenko I., Entel P. The modeling of phase diagrams and premartensitic effects in Heusler Ni–Mn–Ga alloy by Monte Carlo Method // *Phys. Procedia*. 2010. № 10. P. 132–137.
17. Methods for phase diagram determination / ed. J.-C. Zhao. Elsevier, 2004. 517 p.
18. Broz P., Vassilev G., Gandova V., Bursik Jří. Study of Phase Transformations and Phase Equilibria in the Ni–Sn–Zn System // *Abstracts of XL CALPHAD Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry*. May 22–27, 2011. Rio de Janeiro, 2011. P. 198.
19. Beilmann M., Benes O., Konings R. Thermodynamic assessment of a Molten Salt Reactor fuel // *Abstracts of XL CALPHAD Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry*. May 22–27, 2011. Rio de Janeiro, 2011. P. 69.
20. Бурчаков А. В. Моделирование фазового комплекса многокомпонентных систем с участием хроматов и галогенидов щелочных металлов : дис. ... канд. хим. наук. Самара, 2016. 185 с.
21. Бурчаков А. В., Дворянова Е. М., Кондратюк И. М. Особенности расслаивания жидких фаз в квазитройной системе $\text{LiF–RbI–Li}_2\text{CrO}_4$ // *Бутлеровские сообщения*. 2014. Т. 38, № 5. С. 72–77.
22. Бурчаков А. В., Дворянова Е. М., Кондратюк И. М. Экспериментальное исследование и компьютерное моделирование стабильного треугольника $\text{LiF–KI–K}_2\text{CrO}_4$ четырехкомпонентной взаимной системы $\text{Li, K||F, I, CrO}_4$ // *Бутлеровские сообщения*. 2015. Т. 42, № 6. С. 59–67.
23. Бурчаков А. В., Дворянова Е. М., Кондратюк И. М. Фазовые равновесия в трехкомпонентной взаимной системе Li, K||I, CrO_4 // *Журн. неорг. химии*. 2015. Т. 60, № 8. С. 1100–1109.
24. Моховоев М. В., Алексеев Ф. П., Луцык В. И. Диаграммы состояния молибдатных и вольфраматных систем. Новосибирск : Наука. Сиб. отд-ние, 1978. 319 с.
25. Гаркушин И. К., Губанова Т. В., Петров А. С., Анищенко Б. В. Фазовые равновесия в системах с участием метаванадатов некоторых щелочных металлов. М. : Машиностроение-1, 2005. 118 с.
26. Кошкаров Ж. А., Луцык В. И., Моховоев М. В., Воробьева В. П., Гаркушин И. К., Трунин А. С. Ликвидус системы $\text{Li||WO}_4, \text{F, Cl(NO}_3)$ и $\text{Li||WO}_4, \text{VO}_3, \text{Cl(Br)}$ // *Журн. неорг. химии*. 1987. Т. 32, вып. 6. С. 1480–1483.
27. ACerS-NIST. Phase Equilibria Diagrams. CD-ROM Database. Version 3.1.0. American Ceramic Society. National Institute of Standards and Technology. Order online: www.ceramics.org.
28. Ганин Н. Б. Проектирование и прочностной расчет в системе КОМПАС-3D V13. 8-е изд., перераб. и доп. М. : ДМК Пресс, 2011. 320 с.

Computer Model of Phase Complex of Ternary System $\text{LiCl–Li}_2\text{MoO}_4\text{–Li}_2\text{WO}_4$

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

Alexander V. Burchakov, <https://orcid.org/0000-0002-3202-3405>, Samara State Technical University, 244, Molodogvardeyskaya Str., Samara, 443100, Russia, turnik27@yandex.ru

Ivan K. Garkushin, <https://orcid.org/0000-0001-6038-8519>, Samara State Technical University, 244, Molodogvardeyskaya Str., Samara, 443100, Russia, gik49@yandex.ru

Sergey N. Milov, <https://orcid.org/0000-0001-8531-5885>, Samara State Technical University, 244, Molodogvardeyskaya Str., Samara, 443100, Russia, milov_sergei@mail.ru

The solution of theoretical and practical problems based on phase equilibria in multicomponent systems is the basis of materials science: the synthesis of metals, alloys, semiconductors and many other substances and mixtures. The first stage in the study of phase diagrams is their calculation by various methods. However, the current state of the theory does not allow us to calculate the phase diagrams accurately and correctly even for binary systems. At the same time, an experimental study of phase equilibria allows



one to obtain the most reliable and complete information about the properties of systems. But this is achieved at the cost of significant material and time spent. As the number of components of the studied systems increases, these costs multiply. Widely used in recent years, the experiment planning methods do not significantly reduce the amount of experimental studies of multi-component systems. The application of different types of models of phase systems makes it possible to simplify their study. In the present work, a theoretical study of the phase complex of the three-component $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ system using 3D modeling in the program-editor KOMPAS-3D is carried out. The construction of points of non-variant equilibrium states, lines of univariant equilibria and surfaces of divariant equilibria in the space of the model from points obtained experimentally in studying the ele-

ments of faceting is carried out. The results of the model analysis are isothermal and polythermal sections, the material balance diagram. The model makes it possible to perform a temperature forecast and a sequence of crystallizing phases for a mixture with an arbitrary ratio of the components of the system.

Key words: phase equilibria, concentration triangle, computer model, basic geometric elements of the model, liquidus, molybdate, tungstate, lithium chloride, T - x - y -phase diagram, phase complex of the system, minimum, continuous series of solid solutions.

Acknowledgements: *This 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:

Бурчаков А. В., Гаркушин И. К., Милов С. Н. Компьютерная модель фазового комплекса трехкомпонентной системы $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$ // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 370–377. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-370-377>

Cite this article as:

Burchakov A. V., Garkushin I. K., Milov S. N. Computer Model of Phase Complex of Ternary System $\text{LiCl-Li}_2\text{MoO}_4\text{-Li}_2\text{WO}_4$. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 370–377 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-370-377>



УДК 544.344.2:544.344.012-013-016:544.344.015.32-33

ФАЗОВЫЕ РАВНОВЕСИЯ И РАСТВОРИМОСТЬ КОМПОНЕНТОВ В ДВОЙНОЙ СИСТЕМЕ ВОДА–ДИПРОПИЛАМИН



М. П. Смотров, В. А. Уметчиков, В. В. Данилина, Д. Г. Черкасов

Смотров Максим Павлович, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и неорганической химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ilinkk@info.sgu.ru

Уметчиков Валерий Александрович, студент 4-го курса Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ilinkk@info.sgu.ru

Данилина Вероника Владимировна, магистрант 2-го года Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ilinkk@info.sgu.ru

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

Дипропиламин является одним из перспективных антирастворителей для экстрактивной кристаллизации солей, однако его растворимость в воде и фазовые равновесия в его водных растворах в широком интервале температур до сих пор подробно не изучены. Обзор литературы показал, что систему вода–дипропиламин относят к расслаивающимся системам с нижней критической температурой растворения (НКТР). Нами визуально-политермическим методом в интервале -25 – 90 °C изучены фазовые равновесия в двойной системе вода–дипропиламин, построена фазовая диаграмма системы. Детальное изучение фазовых состояний выявило, что расслоение ниже -1.9 °C осуществляется в переохлажденных смесях воды и дипропиламина, т.е. является неравновесным. На той части бинадальной кривой, которая находится в метастабильной области, методом отношения объема фаз определены координаты нижней критической точки: НКТР = -4.7 °C, 27.2 мас.% дипропиламина. Впервые установлено, что при -1.9 °C в системе осуществляется невариантное монотектическое равновесие, твердой фазой которого является лед. Впервые определено, что вода и дипропиламин образуют конгруэнтно плавящееся при -15.6 °C соединение $2(C_3H_7)_2NH \cdot H_2O$. При температуре -20.4 °C в системе осуществляется эвтектическое равновесие, твердыми фазами которого являются лед и химическое соединение $2(C_3H_7)_2NH \cdot H_2O$.

Ключевые слова: растворимость, фазовые равновесия, критические явления, двойная система, фазовая диаграмма, монотектическое состояние, расслоение, алифатические амины, дипропиламин.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-378-382>

Алифатические амины широко используются в производстве гербицидов, эмульгаторов, ингибиторов коррозии металлов, при стабилиза-

ции трихлор- и перхлорэтилена. Относительно новой областью применения низкомолекулярных аминов является их использование в качестве антирастворителей в процессе экстрактивной кристаллизации солей. Для данного способа получения солей наиболее подходящими свойствами обладают вторичные и третичные амины, так как их водные растворы имеют достаточно низкую нижнюю критическую температуру растворения (НКТР). Одним из перспективных антирастворителей является дипропиламин.

Двойную систему вода–дипропиламин многие исследователи относят к расслаивающимся системам с нижней критической температурой растворения [1–5]. Впервые эта система была исследована R. W. Hobson с соавторами [1] в интервале -4.8 – 74.8 °C. Было установлено, что НКТР в этой системе равна -4.8 °C. Растворимость компонентов в работе определяли визуально-политермическим методом. Авторы отмечают, что состав смеси, отвечающий критическому раствору, приблизительно составляет 34 мас.% амина, однако не указывают метод, с помощью которого он определен. В статье также указано, что при температуре -5 °C в смеси состава 25.21 мас.% дипропиламина наблюдается голубая опалесценция. Вероятно, опалесценция является свидетельством критических явлений в околоскритической области. Анализ представленных в работе [1] данных позволяет сомневаться в точности приведенных авторами состава и температуры критического раствора.

В работе [2] приводятся данные по взаимной растворимости для смесей компонентов 51 двойной системы вода–амин в интервале температур 0 – 90 °C, в том числе для двойной системы вода–дипропиламин. Растворимость автор определял методом стандартных добавок. Смеси воды и амина термостатировали при определенной температуре, затем отбирали равновесные фазы и с помощью газовой-жидкостной хроматографии определяли их состав. В работе [2] не исследовали растворимость компонентов ниже 0 °C и не определили координаты нижней критической точки (НКТ).

Э. И. Степанова с соавторами [3] определили взаимную растворимость компонентов двойной



системы *вода–дипропиламин* при 30°C. Содержание амина в водной фазе составляло 3.7 мас.%, а в органической – 80.4 мас.%.

I. Nagata с соавторами [4], используя модели UNIQUAC и расширенный UNIQUAC, рассчитали бинодальную кривую в двойной системе *вода–дипропиламин*. Рассчитанная с помощью расширенной модели UNIQUAC бинодальная кривая для системы *вода–дипропиламин* хорошо согласуется с данными, приведенными в [1]. Однако состав, отвечающий НКТ, авторы работы [4] не указали.

М. Gógal с соавторами [5] провели литературный обзор по взаимной растворимости компонентов 24 двойных систем *вода–алифатический амин*, в том числе и *вода–дипропиламин*. В работе с помощью математических уравнений провели аппроксимацию из данных, полученных в работах [1–3] и построили бинодальную кривую. Для расчетов было использовано значение НКТР, равное 268.4 К (–4.75°C), а содержание дипропиламина в смеси, отвечающей критическому составу, было равно 5 мол.% (22.8 мас.%). Данная критическая температура близка к НКТР, определенной R. V. Hobson с соавторами [1], однако критический состав значительно отличается от полученного в [1]. Следует отметить, что критический состав рассчитывался в [5] с помощью математических уравнений.

Таким образом, экспериментальные данные по взаимной растворимости в двойной системе *вода–дипропиламин*, полученные R. V. Hobson [1] и Э. И. Степановой с соавт. [3], хорошо согласуются и значительно отличаются от полученных в [2]. Значительные отклонения (~5 мас.%) проявляются в области концентраций, богатой амином. Примерные координаты НКТ определены только в [1], причем их достоверность вызывает сомнение. Фазовые состояния в смесях компонентов двойной системы *вода–дипропилами* при температурах ниже –4.8°C вообще не исследованы.

Настоящая работа посвящена политермическому изучению фазовых равновесий и критических явлений в двойной системе *вода – дипропиламин* с целью построения ее фазовой диаграммы и определения растворимости компонентов в широком интервале температур.

Материалы и методы

В работе были использованы вода и дипропиламин. Бидистиллированную воду ($n_D^{20}=1.3330$) получали на аппарате DEM-20 «MERA-POLNA». Препарат дипропиламина (Acrossorganics) с

содержанием основного вещества $\geq 99.0\%$ ($t_{\text{кип}}=110.7^\circ\text{C}$, $n_D^{20}=1.4050$) не подвергали дополнительной очистке. Растворители идентифицировали по температуре кипения, показателю преломления n_D^{20} ; их физические константы совпали в пределах погрешности измерений со справочными данными [6].

Фазовые равновесия в смесях компонентов двойной системы $\text{H}_2\text{O}-(\text{C}_3\text{H}_7)_2\text{NH}$ изучали визуально-политермическим методом [7] в стеклянных ампулах при давлении паров в интервале –25–90°C. Состав раствора, соответствующий критической точке растворимости, определяли экспериментально методом отношения объемов жидких фаз [8] и подтверждали графически путем построения диаметра В. Ф. Алексеева [9] на поле расслоения фазовой диаграммы системы. Необходимую температуру поддерживали при помощи термостата Lauda A-100 и низкотемпературного термостата «Крио-вист-Т-05» с погрешностью 0.1°C. Температуру измеряли калиброванными децимальными ртутными термометрами с погрешностью 0.1°C. Равновесие жидкость–жидкость в смесях компонентов устанавливалось в течение 1 ч, равновесие жидких и твердой фаз достигалось через 3 ч при непрерывном перемешивании смеси. Признаком установления равновесия являлась воспроизводимость результатов измерений температур фазовых переходов при подходе к ним со стороны как более низких, так и более высоких температур для переходов $l_1 \rightleftharpoons l_1 + l_2$ и $l_2 \rightleftharpoons l_1 + l_2$ или только со стороны более низких температур для переходов $l_1 + S \rightleftharpoons l_1$, $l_2 + S \rightleftharpoons l_2$, $l_1 + S_1 \rightleftharpoons l_1$, $l_1 + S \rightleftharpoons l_1 + l_2 + S \rightleftharpoons l_1 + l_2$.

Результаты и их обсуждение

Для построения фазовой диаграммы двойной системы *вода–дипропиламин* политермически исследованы фазовые равновесия и критические явления в тридцати трех смесях компонентов (табл. 1). На полученной фазовой диаграмме (рисунок) бинодальная кривая отделяет поле расслоения $l_1 + l_2$ от полей гомогенно-жидкого состояния (обозначены как l_1 и l_2). На поле двухжидкофазного равновесия построены ноды и определены графически составы равновесных жидких фаз при восемнадцати температурах (табл. 2). Состав критической смеси (26.5 мас.% дипропиламина) был определен графически с помощью диаметра Алексеева, проведенного через середины нод до пересечения с бинодальной кривой. Этот состав немного отличается



Таблица 1

Температуры переходов фазовых состояний в зависимости от содержания дипропиламина в двойной системе вода–дипропиламин

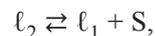
ДПА, мас.%	$l_2 \rightleftharpoons l_2+S$	$l_2 \rightleftharpoons l_1+l_2$	$l_1+S \rightleftharpoons l_1+l_2$	$l_1+l_2 \rightleftharpoons l_1$	$l_1 \rightleftharpoons l_1+S$	$l_1 \rightleftharpoons l_1+S_1$
0.00	0.0					
1.34	-0.1	87.4				
1.68	-0.1	62.6				
2.01	-0.1	53.8				
3.52	-0.4	30.6				
5.13	-0.6	18.8				
8.18	-1.2	2.8				
10.48			-1.9			
16.03			-1.9			
20.26			-1.9			
25.13			-1.9			
25.85			-1.9			
26.24			-1.9			
27.04			-1.9			
27.20			-1.9			
29.96			-1.9			
39.90			-1.9			
46.94				-1.7	-2.0	
49.97				-0.1	-2.6	
59.94				5.7	-3.5	
70.06				13.5	-6.8	
75.64				21.8	-13.3	
78.73				27.6	-18.8	
80.83				30.5		-19.8
82.48				34.4		-19.6
85.01				39.1		-18.4
87.54				45.4		-17.8
90.33				58.0		-16.4
91.49				65.2		-16.2
92.62				70.7		-15.6
93.04				75.8		-16.2
93.56						-16.6
95.02						-17.8
97.20						-20.0

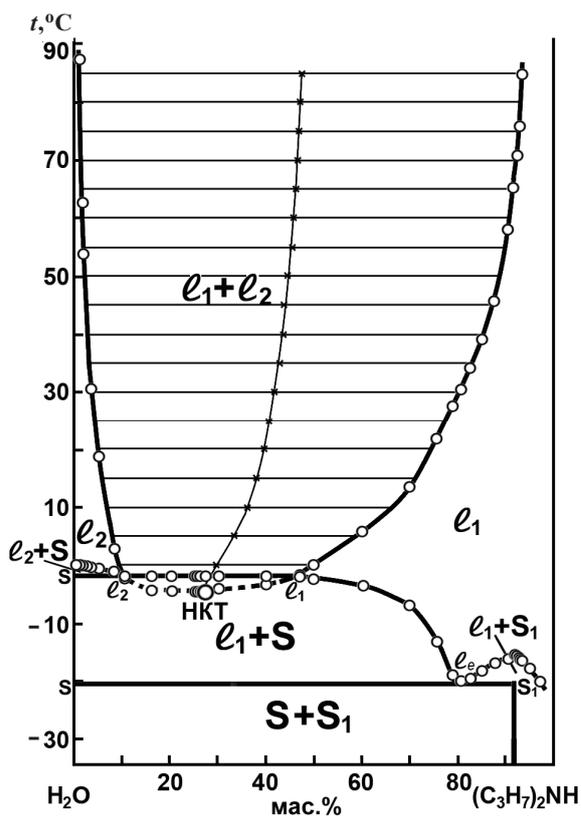
от определенного нами экспериментально по методу отношения объемов фаз (27.2 мас.% дипропиламина). Нижняя критическая температура растворения составила -4.7°C .

Было установлено, что часть бинальной кривой ниже -1.9°C (на рисунке обозначена пунктиром) соответствует метастабильному равновесию $l \rightleftharpoons l_1 + l_2$, которое наблюдается в переохлажденных жидких смесях. На этой части

бинальной кривой располагается НКТ (температура -4.7°C , содержание амина 27.2 мас.%). Фазовая диаграмма системы вода–дипропиламин представлена на рисунке.

На фазовой диаграмме при -1.9°C линия кристаллизации льда l_1+S соприкасается с бинальной кривой и образуется трехфазное неинвариантное монотектическое состояние:





Фазовая диаграмма двойной системы вода–дипропиламин в интервале $-25-90^{\circ}\text{C}$

Таблица 2

Составы равновесных жидких фаз в двойной системе вода–дипропиламин

$t, ^{\circ}\text{C}$	Содержание дипропиламина в равновесных жидких фазах, мас.%	
	Водная фаза	Органическая фаза
0.0	9.2	50.2
5.0	7.5	59.2
10.0	6.2	66.0
15.0	5.8	70.8
20.0	5.0	74.0
25.0	4.2	77.1
30.0	3.5	80.1
35.0	2.8	82.8
40.0	2.4	85.2
45.0	2.2	87.2
50.0	2.1	88.8
55.0	2.0	89.8
60.0	1.9	90.8
65.0	1.8	91.5
70.0	1.6	92.6
75.0	1.5	93.0
80.0	1.4	93.3
85.0	1.2	93.5

где l_1 – органическая фаза, l_2 – водная фаза, S – твердая фаза, представляющая собой кристаллы льда. Ниже неинвариантной температуры наблюдается двухфазное моновариантное состояние l_1+S , представляющее собой насыщенный в отношении кристаллов льда раствор с большим содержанием амина. Выше неинвариантной температуры на фазовой диаграмме находятся поля насыщенных в отношении кристаллов льда растворов с высоким содержанием воды в жидкой фазе l_2+S и двух жидких фаз l_1+l_2 . С повышением температуры взаимная растворимость воды и дипропиламина уменьшается и область расслоения увеличивается.

В области высоких концентраций амина на линии ликвидуса существует четко выраженный максимум. Этот максимум, вероятно, соответствует химическому соединению воды и дипропиламина. Исходя из вида максимума, можно сделать вывод, что данное соединение плавится без разложения при -15.6°C , т.е. является конгруэнтным. Состав соединения определен только графически по диаграмме: $2(\text{C}_3\text{H}_7)_2\text{NH}\cdot\text{H}_2\text{O}$. На рисунке твердая фаза, отвечающая этому химическому соединению, обозначена как S_1 .

При -20.4°C в изучаемой системе осуществляется трехфазное неинвариантное эвтектическое состояние:



где l_1 – органическая фаза, S – твердая фаза, представляющая собой кристаллы льда, S_1 – твердая фаза, отвечающая химическому соединению. Эвтектическая точка определена графически и соответствует смеси, содержащей 80.4 мас.% дипропиламина.

Таким образом, двойная система вода–дипропиламин не относится к двойным расслаивающимся системам с НКТР. Впервые установлено, что в данной системе при -1.9°C происходит образование неинвариантного монотектического состояния. Фазовые переходы, отвечающие расслоению, при температурах ниже -1.9°C осуществляются в переохлажденных смесях воды и дипропиламина, т.е. являются неравновесными. Стоит отметить, что определенная нами НКТР метастабильного фазового перехода (-4.7°C) совпала в пределах погрешности ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$) с критической температурой из работы [1], однако составы критических растворов сильно отличаются. Впервые определено, что вода и дипропиламин образуют конгруэнтно плавящееся соединение состава $2(\text{C}_3\text{H}_7)_2\text{NH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ($t_{\text{пл}} = -15.6^{\circ}\text{C}$).



Список литературы

1. Hobson R. W., Hartman R. J., Kanning E. W. A Solubility Study of Di-n-propylamine // J. Am. Chem. Soc. 1941. Vol. 63. P. 2094–2095.
2. Stephenson R. M. Mutual Solubility of Water and Aliphatic Amines // J. Chem. Eng. Data. 1993. Vol. 38. P. 625–629.
3. Степанова Э. И., Кухаренок И. С., Куражева А. В., Харисов М. А. Исследование фазового равновесия жидкость–жидкость в системе пропанол–вода–ди-н-пропиламин при 30°C // Журн. прикл. химии. 1988. Т. 61. С. 1180–1181.
4. Nagata I., Meyer T., Gmehling J. Correlation of binary liquid-liquid equilibrium data over a wide temperature range using UNIQUAC and extended UNIQUAC models // Fluid Phase Equilibria. 1991. Vol. 65. P. 19–39.
5. Góral M., Shaw D. G., Maczynski A., Wisniewska-Gocłowska B., Oracz P. IUPAC-NIST Solubility Data Series. 96. Amines with Water. Part 1. C4–C6 Aliphatic Amines // J. of Phys. and Chem. Ref. Data. 2012. Vol. 41, № 4. P. 043106 (40 p.).
6. Химическая энциклопедия : в 5 т. / гл. ред. И. Л. Кнунянц. М. : Сов. энцикл., 1988–1998.
7. Аносов В. Я., Озерова М. И., Фиалков Ю. Я. Основы физико-химического анализа. М. : Наука, 1976. 504 с.
8. Трейбал Р. Жидкостная экстракция : пер. с англ. / под ред. С. З. Кагана. М. : Химия, 1966. 724 с.
9. Алексеев В. Ф. О взаимной растворимости жидкостей // Горн. журн. 1879. Т. 4, № 10. С. 83–114.

Phase Equilibria and Component Solubility in the Binary System *Water + Dipropylamine*

M. P. Smotrov, V. A. Umetchikov,
V. V. Danilina, D. G. Cherkasov

Maksim P. Smotrov, <https://orcid.org/0000-0003-0692-9139>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilinkk@info.sgu.ru

Valeriy A. Umetchikov, <https://orcid.org/0000-0001-6558-7381>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilinkk@info.sgu.ru

Veronika V. Danilina, <https://orcid.org/0000-0001-6385-2428>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilinkk@info.sgu.ru

Dmitry G. Cherkasov, <https://orcid.org/0000-0002-6862-1917>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilinkk@info.sgu.ru

Dipropylamine is one of the promising antisolvents for extractive salt crystallization, but its solubility in water and phase equilibria in its aqueous solutions over a wide temperature range has not been studied in detail until now. The review of the literature shows that the water-dipropylamine system is classified as a self-separating system with a lower critical solution temperature (LCST). We used the visual-polythermal method in a -25 – 90°C range to study phase equilibria in the binary system water-dipropylamine and to plot the phase diagram of the system. A detailed study of phase states has revealed that the separation below -1.9°C takes place in overcooled mixtures of water and dipropylamine, i.e. it is nonequilibrium. On the part of the binodal curve that is in the metastable region, the coordinates of the lower critical solution temperature were evaluated by the phase volume ratio method: $\text{LCST} = -4.7^\circ\text{C}$, 27.2 wt.% of dipropylamine. It was established for the first time that a non-invariant monotectic equilibrium takes place in the system at -1.9°C , whose solid phase is ice crystals. It was found for the first time that water and dipropylamine form the compound $2(\text{C}_3\text{H}_7)_2\text{NH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ congruent melting at -15.6°C . At -20.4°C , the system has a eutectic equilibrium, whose solid phases are ice and the chemical compound $2(\text{C}_3\text{H}_7)_2\text{NH}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Key words: solubility, phase equilibria, critical phenomena, binary system, phase diagram, monotectic state, delamination, aliphatic amine, dipropylamine.

Образец для цитирования:

Смотров М. П., Уметчиков В. А., Данилина В. В., Черкасов Д. Г. Фазовые равновесия и растворимость компонентов в двойной системе вода–дипропиламин // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 378–382. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-378-382>

Cite this article as:

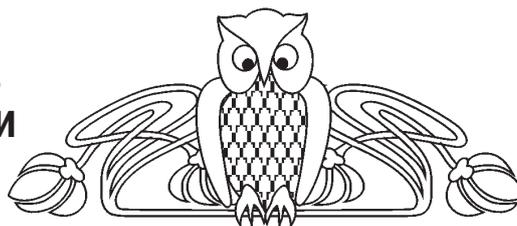
Smotrov M. P., Umetchikov V. A., Danilina V. V., Cherkasov D. G. Phase Equilibria and Component Solubility in the Binary System *Water+Dipropylamine*. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 378–382 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-378-382>



УДК 54.01.544.01

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОПОДОБНЫХ ГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МЕТОДА ПОЛИИОННОЙ СБОРКИ

А. В. Ермаков, С. Б. Вениг



Ермаков Алексей Вадимович, аспирант факультета нано- и биомедицинских технологий, младший научный сотрудник лаборатории дистанционно управляемых систем для тераностики Образовательно-научного института наноструктур и биосистем, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ermakov.ssu@gmail.com

Вениг Сергей Борисович, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой материаловедения, технологии и управления качеством, декан факультета нано- и биомедицинских технологий, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, sergey.venig@gmail.com

Природные композитные структуры, такие как роговые кости и перламутр, имеют высокоупорядоченную структурную организацию в наномасштабе. Подобная архитектура материала вызывает широкий интерес к искусственной имитации таких систем с целью разработки сложных композитных материалов с адаптируемыми механическими свойствами. С целью установления перспектив развития лабораторных методов синтеза механически прочных биоподобных материалов в данной статье проведен обзор работ по фундаментальным принципам формирования, структуре и свойствам природных композитных биоминерализованных материалов, а также по результатам методов искусственного синтеза таких материалов, включая метод химической инфильтрации, где частицы карбоната кальция зарождаются и растут внутри мультислойных полиэлектrolитных пленок, полученных методом полиионной сборки. Определяющая роль полимерной матрицы в процессе образования и роста неорганической фазы в совокупности с уникальными возможностями полиионной сборки контроля состава и иерархии полимерных пленок открывает широкие возможности для искусственного синтеза композитных пленок с уникальными механическими характеристиками.

Ключевые слова: биоминерализация, композиты, полимеры, карбонат кальция.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-383-389>

Введение

За последнее десятилетие в области нанотехнологий и нанокompозитов произошел значительный прорыв. Для синтеза биоподобных тонкопленочных материалов разработан ряд методов [1]. В сочетании с современными методами нано- и микроупорядочивания могут быть синтезированы материалы с трехмерной управляемой в наномасштабе архитектурой, включая контроль поперечного распределения слоев, их формы, размеров и состава [2–4].

Так, полиионная сборка полиэлектrolитных мультислойных пленок широко использована в комбинации с наночастицами для получения высокоэффективных и высококачественных тонкопленочных композитных материалов [2, 3, 5–7]. Такая архитектура достигается за счет циклического осаждения и сверхкомпенсации заряда, когда высокомолекулярные составляющие адсорбируются на границе раздела твердой и жидкой фаз. Это делает метод полиионной сборки привлекательной альтернативой другим методам осаждения тонких пленки, включая метод Ленгмюра–Блоджетт, электрофорез, спинкоутинг и распыление [8–10]. Последовательная организация стабилизированных наночастиц посредством электростатической адсорбции на противоположно заряженных слоях полиэлектrolитов делает метод полиионной сборки особенно подходящим для синтеза слоистых тонких пленок, где иерархическая организация может быть достигнута путем управления вертикальным распределением слоев на нанометровом уровне в заранее определенной последовательности. Такой подход позволит создавать материалы для применения в фотонных, электронных и медицинских областях, что уже широко используется [11].

Однако область механически сильных композитов, полученных методом полиионной сборки неорганических и органических составляющих, имитирующих природные биоминерализованные композиты [12, 13], не была исследована. В этой области было проведено несколько принципиальных исследований, показавших, что полиэлектrolитная матрица может создавать небольшие слоистые комплексы с наночастицами, которые обладают свойствами, аналогичными жестким высокоэффективным биологическим керамикам, таким как перламутр, которые образуются путем биоминерализации [14–18]. Перламутр, состоящий из комбинации неорганических и органических макромолекул, демонстрирует уникальную комбинацию прочности и эластичности [19, 20]. Кроме того, такие упорядоченные наноструктуры достигли необычного уровня оптической прозрачности [21, 22]. Разработка многофункциональных пленок привела к появлению целого спектра уни-



версальных применений, и концепция послойного нанесения компонентов широко исследована [23–26]. Дальнейшие улучшения были достигнуты при изучении троичного искусственного перламутра, который имеет потенциальное применение в аэрокосмических материалах, электродах для гибких суперконденсаторов и в области тканевой инженерии, для развития искусственных мышц [27]. Биоподобные материалы представляют большой интерес благодаря разнообразию форм и подходов [20]. Например природные раковины из перламутра представляют большой интерес для исследователей благодаря их удивительной иерархической организации и прочности [28]. Более того, искусственные перламутровые функциональные гибридные пленки набирают популярность как новое поколение биоподобных материалов благодаря их механическим свойствам [29, 30]. В связи с этим фундаментальное понимание и технологии поэтапного осаждения для получения биоподобных материалов непрерывно развиваются.

Понимание естественных механизмов биоминерализации, а также развитие синтетических (биоподобных) подходов к подражанию этим механизмам достигли значительного прогресса в течение последнего десятилетия [31–35]. Рассматривая синтез материалов, крайне важно подумать об иерархической организации и управлении размером, формой и полиморфизмом в условиях окружающей среды [36]. Кроме того, вызвала большой интерес роль органической матрицы, и процесс минерализации был тщательно проанализирован различными исследовательскими группами, что будет обсуждаться ниже. В конечном итоге критическую нагрузку данного материала определяет поверхностная структура биологического композита. Ширина, жесткость и содержание неорганического наполнителя определяют динамические напряжения, которые присутствуют в материале [37, 38]. Биологические системы, которые имеют больший диапазон по данным показателям, могут легко адаптироваться к относительно высоким динамическим напряжениям. Определяющую роль играет полимерный состав органической матрицы при формировании композита. Как структурные (нерастворимые), так и растворимые биополимеры в органическом каркасе играют важную роль в контроле зародышеобразования, роста и развития неорганической фазы [1]. Например, в перламутре моллюсков наружные призматические структуры кальцита находятся в каркасе богатых глицином белков и содержат волокна хитина, встроенные в кристаллы, в то время как семейство растворимых белковых кислот содержится в обеих областях с предполагаемой функциональной

ролью адсорбирования на каркасе и индуцирования зародышеобразования минералов [39]. В перламутре арагонитовые пластины известны как композитные мезокристаллические структуры, причем нанокристаллы разделены слоями органической матрицы [40]. В последнее время также накопилось большое количество доказательств того, что аморфная фаза неорганического компонента играет важную роль на ранних стадиях биоминерализации [41, 42]. Предполагают, что на начальных стадиях минерализации аморфная фаза неорганики находится в везикулах, которые переносятся в центры зародышеобразования в органической матрице, такое предположение сделано на основе исследований костей рыб и морских ежей, в которых был обнаружен аморфный фосфат кальция [43, 44]. Аморфный карбонат кальция в значительной степени содержится в другом важном классе биоминерализованных тканей, а именно в кальцинированной надкожице членистоногих, которую можно рассматривать как композит хитина, белка и карбоната кальция [45]. Процесс биоминерализации включает в себя получение новой кристаллической фазы. Поэтому зародышеобразование играет решающую роль в первичных строительных блоках биоминерализации в сложной структуре [46]. Классическая теория зародышеобразования предполагает спонтанное образование сферических молекулярных кластеров с зависимыми от размера свободными энергиями при преодолении определенного критического радиуса.

Принимая во внимание все эти факторы, образование биоподобных структур с использованием управляемой поэтапной сборки является крайне перспективным направлением для создания биоподобных материалов [47, 48].

Природа и перламутр

В природе встречается множество подобных гибридных систем с различными вариантами архитектуры [49]. Такие структуры способны адаптироваться к требуемым функциям организма. Биологические композиты имеют сложную и умную структурную организацию органических и минеральных компонентов с пластичными и хрупкими свойствами. Слоистая компоновка внутри этих природных композитов в значительной степени способствует их высоким механическим показателям.

Природные композитные материалы проявляют ряд свойств, важных для повседневной деятельности организма [13]. Примерами таких композитов являются сухожилия, соединительная ткань, оленьи рога и находящийся в раковине



нах перламутр [50, 51]. Сухожилие – это мягкая соединительная ткань, структурные единицы которой основаны на коллагеновых волокнах, которые могут иметь диаметр до 300 микрон, в дополнение к этому существует сложная сеть, состоящая из фибробластов (до 86% мас.) и воды (5% мас.) [52]. Сеть сложным образом переплетена, посредством чего мышечное натяжение передается для равного распределения нагрузки, особенно в областях движения – суставах [53]. Пучки коллагена составляют массовые волокнистые соединения, которые выровнены параллельно длине оси сухожилия [54]. Структурная организация в сухожилиях адаптирует ее к определенным условиям нагрузки, поскольку она подвержена циклической нагрузке, в то же время испытывая сдвиговые и сжимающие напряжения в дополнение к напряжению на протяжении всей жизни [21, 55]. Другой пример – перламутр – является исключительным гибридным материалом с его структурой и связанными с ней механическими свойствами [19]. Перламутр – это органический компонент, вырабатываемый двустворчатыми, брюхоногими и головоногими моллюсками, структурированный для обеспечения защиты мягких тканей организма. Модули, прочность на изгиб и вязкость перламутра сравнимы с синтетическими керамическими материалами из оксида алюминия [55–57]. Специфический отблеск перламутра объясняется наличием пластин гексагонального арагонита (кристаллизованным карбонатом кальция) толщиной около 0,5 мкм (соизмеримо с длиной волны света), вызывающих интерференцию на разных длинах волн видимого света, придавая материалу радужную оболочку [15]. Полностью сформированная оболочка может иметь диаметр до 150–200 мм и в основном состоять из двух основных слоев разных фаз. Хрупкий слой, который лежит на внешней стороне, состоит из кристаллов кальция большего размера и внутреннего слоя, который составлен из 95% объемной доли арагонита и 5% объемной доли белков и полисахаридов. Пластины арагонита в органической матрице из эластичных белков образуют слоистый композит с характерной толщиной слоев 10–50 нм [58]. Именно эта эффективная композитная основа придает прочность и твердость материалу и вызывает интерес научного сообщества [29, 59, 60]. Механические характеристики перламутра обеспечивают баланс твердости и эластичности [25, 26], позволяя ему быть устойчивым к высоким ударным нагрузкам и обеспечивать его вязкоупругие свойства. Исследования показали, что перламутр не только проявляет высокие

структурные свойства, что подтверждено методом просвечивающей электронной микроскопии (показано, что перламутр способен реагировать как монокристалл при фактической субдиффренцированной высококристаллической структуре), но и обладает высокой биосовместимостью [61, 62]. Такое сочетание свойств показывает перспективы использования комбинированных материалов в тканевой инженерии для достижения технологических задач.

В статье [15] проведено сравнительное исследование образцов перламутра, сформированных в естественных условиях и полученных в лабораторных условиях с использованием мультислойных полиэлектролитных пленок, и обнаружено, что итоговая прочность на растяжение естественного перламутра составляет 130 МПа, модуль Юнга 64 ГПа [15], тогда как искусственный перламутр имеет соответствующие значения 100 ± 10 МПа и модуль Юнга 11 ± 2 ГПа. Различие в модуле Юнга объясняется наличием в искусственном перламутре крупных пластин карбоната кальция, что обуславливает дополнительное трение между ними.

В связи с этим синтез материалов, подобных перламутру с его внутренней иерархией, состоящей из арагонитовых пластин и белков, представляет большой интерес. Для разработки методов получения подобных материалов нового поколения применяется биоподобный подход, который исследует биологические структуры и устанавливает связь между структурой и свойствами [39, 63]. В области биоподобия ученые [22, 23, 30, 31, 64] постоянно ставят новые цели, пытаются изготовить синтетические материалы, которые обладают подобными структурами и превосходными механическими свойствами, для получения передовых и многофункциональных композитов.

Лабораторный синтез

Ориентируясь в качестве примера на композиты из карбоната кальция с полимерами (перламутр моллюсков), были разработаны несколько синтетических подходов к формированию биоподобных гибридов на основе неорганических и органических соединений, сходные с перламутром [22]. Исследования в этой области были сосредоточены главным образом на разработке неорганических компонентов природных материалов, таких как костная ткань, перламутр и оболочки моллюсков [42, 56]. Синтез карбоната кальция внутри деминерализованного органического каркаса перламутра был достигнут посредством локальных областей осаждения карбоната



кальция [65]. Недавно разработанные композиты состава «органика–неорганика» продемонстрировали изменение морфологических свойств самого материала. В этих исследованиях тонкопленочные кристаллы карбоната кальция выращивали с помощью комбинации полимерной тонкой пленки и простых полимерных кислот, таких как полиакриловая кислота (ПАА) и полиглутаминовая кислота (ПГА) [44, 66]. Кристаллический биоподобный карбонат кальция был сформирован из совместного эффекта нерастворимых полисахаридов, таких как хитин, и полимерных кислот, включая полиакриловую кислоту, что позволило контролировать рост нанокристаллов карбоната кальция в пленках [67]. Сочетание биомакромолекул, таких как белки и полисахариды, играет определяющую роль в морфологическом контроле образующихся биоминералов [68]. Ряд исследований *in vitro* зародышеобразования и роста биологических минералов показал, что на их морфологию влияют экстрагированные органические компоненты. Природа и интервал функциональных групп в полимерах матрицы играют решающую роль в определении типа кристаллографической формы образующегося CaCO_3 , при этом ПАА приводит к образованию арагонита, а поли(глутаминовая) кислота – к возникновению фазы ватерита [69]. Инкубация карбоната кальция в жидко-кристаллических фазах, полученных из хитина с последующим гелеобразованием и деформацией, приводит к образованию стержнеподобных кристаллов внутри геля [70].

Большое количество исследований было проведено по оптимизации механизмов процесса биоминерализации в качестве попытки разработать структуры новых материалов [71]. Превосходные механические характеристики естественных материалов, таких как перламутр, первоначально были приписаны его уникальной микроструктуре. За последнее десятилетие были проведены исследования механического поведения и моделирования перламутра, которые показали, что микроструктурная организация имеет высокую степень влияния на характеристики и прочность этих материалов, как описано в приведенных ниже параметрах [72], среди которых:

- 1) упорядоченное расположение перламутровых пластин;
- 2) нанощероховатости на пластинах, обнаруженные посредством анализа трения [72];
- 3) минеральные мосты, соединяющие слои белка между соседними минеральными пластинами, усиливающие механизм упрочнения, что, в свою очередь, приводит к усилению механических свойств.

Исследования пресноводного перламутра позволили достичь более высокой степени минерализации с более толстым перламутровым слоем, занимающим 80% от общей толщины оболочки. Механические характеристики также ограничены в зависимости от содержания воды в оболочке, так как с увеличением содержания воды модуль Юнга и прочность перламутра значительно уменьшаются. Это оказывает влияние на пластичность материала и твердость самой оболочки [72].

Хотя эти результаты показывают способность точно контролировать кристаллизацию карбоната кальция биоподобными подходами на гибких биополимерных пленках и внутри гелей, способность многослойных полимерных нанокомпозитов, полученных методом полиионной сборки для внутреннего разделения и роста фаз минералов, таких как карбонат кальция и фосфат кальция, исследована не была.

Существует несколько причин, по которым полимерные шаблоны, полученные методом полиионной сборки, являются потенциально интересным инструментом для создания нанокомпозитных минеральных / органических гибридов. В 1970-е гг. Ловенштам предложил свою теорию минерализации, управляемой органическими матрицами. Большинство биоминералов состоят из карбоната кальция, фосфата, оксалатов и оксидов кремния или железа [73]. Как было показано выше, кинетика зародышеобразования играет важную роль в развитии данных структур и определяется органической матрицей [4, 74]. Концепция предполагает, что органические вещества могут контролировать зарождение, рост и форму неорганических материалов; это процесс, который генерирует иерархические композитные структуры [75], с уникальными физическими и химическими свойствами. Благодаря тщательной подготовке и контролю параметров можно использовать принципы биоминерализации для синтеза новых материалов, как показано в классической модели перламутров [76].

Метод полиионной сборки позволяет создавать сложные многослойные структуры с контролируемой внутренней пористостью в мезоскопической шкале (~10–100 мкм). Внутренняя пористость и структура пленок полиэлектролита могут быть изменены путем регулирования силы полиэлектролитов при сборке. Такие параметры могут использоваться для контроля роста и перколяции минеральной фазы в ограниченном микроокружении пленки. Кроме того, путем изменения ионной силы прекурсора неорганических растворов в ходе циклического процесса



полионной сборки можно изучить, как изменения в ионной среде влияют на рост неорганической фазы с течением времени, возможно, моделируя временные изменения в локальной тканевой среде.

Заключение

Таким образом, последние исследования показывают, что управляемый синтез в наномасштабе позволяет получать композиты с впечатляющими механическими свойствами, но свойства материалов естественного происхождения остаются недостижимыми. Несмотря на относительно слабые компоненты перламутра, их комплекс составляет материал с выдающимися механическими характеристиками, когда материал сформирован с наномасштабной иерархией. Полионная сборка является перспективным методом для создания полимерных матриц для последующего высококонтролируемого зародышеобразования и роста неорганической фазы внутри органической пленки. Такой подход позволяет контролировать как толщину многокомпонентной пленки, так и состав и ее функции.

Список литературы

1. Yan L., Huck W. T. S., Whitesides G. M. Self-assembled monolayers (SAMs) and synthesis of planar micro- and nanostructures // *J. of Macromol. Science – Polymer Rev.* 2004. Vol. 44, № 2. P. 175–206.
2. Kiryukhin M. V., Gorelik S. R., Man S. M., Subramanian G. S., Antipina M. N., Low H. Y., Sukhorukov G. B. Individually addressable patterned multilayer microchambers for site-specific release-on-demand // *Macromol. Rapid Commun.* 2013. Vol. 34, № 1. P. 87–93.
3. Decher G., Schlenoff J. B. Multilayer Thin Films // *Multilayer Thin Films : Sequential Assembly of Nanocomposite Materials: Second Edition* / eds. G. Decher, J. B. Schlenoff. Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. Vol. 1–2. P. 511–515.
4. Hammond P. T. Form and Function in Multilayer Assembly : New Applications at the Nanoscale // *Adv. Mater.* 2004. Vol. 16, № 15. P. 1271–1293.
5. Decher G. Fuzzy nanoassemblies : Toward layered polymeric multicomposites // *Science.* 1997. Vol. 277, № 5330. P. 1232–1237.
6. Kotov N. A., Dekany I., Fendler J. H. Layer-by-Layer Self-Assembly of Polyelectrolyte-Semiconductor Nanoparticle Composite Films // *J. Phys. Chem.* 1995. Vol. 99, № 35. P. 13065–13069.
7. Aliev F. G., Correa-Duarte M. A., Mamedov A., Ostrander J. W., Giersig M., Liz-Marzán L. M., Kotov N. A. Layer-by-Layer Assembly of Core-Shell Magnetite Nanoparticles : Effect of Silica Coating on Interparticle Interactions and Magnetic Properties // *Adv. Mater.* 1999. Vol. 11, № 12. P. 1006–1010.
8. Porcel C. H., Izquierdo A., Ball V., Decher G., Voegel J.-C., Schaaf P. Ultrathin Coatings and (Poly(glutamic acid)/Polyallylamine) Films Deposited by Continuous and Simultaneous Spraying // *Langmuir.* 2005. Vol. 21, № 2. P. 800–802.
9. Lavallo P., Voegel J.-C., Vautier D., Senger B., Schaaf P., Ball V. Dynamic Aspects of Films Prepared by a Sequential Deposition of Species : Perspectives for Smart and Responsive Materials // *Adv. Mater.* 2011. Vol. 23, № 10. P. 1191–1221.
10. Podsiadlo P., Kaushik A. K., Arruda E. M., Waas A. M., Shim B. S., Xu J., Nandivada H., Pumphlin B. G., Lahann J., Ramamoorthy A., Kotov N. A. Ultrastrong and stiff layered polymer nanocomposites // *Science.* 2007. Vol. 318, № 5847. P. 80–83.
11. Schlenoff J. B., Ly H., Li M. Charge and mass balance in polyelectrolyte multilayers // *J. Amer. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120, № 30. P. 7626–7634.
12. Chen P.-Y., Lin Y. M., Lin Y.-S., Seki Y., Stokes G., Peyras J., Olevsky E., Meyers M., McKittrick J. Structure and mechanical properties of selected biological materials // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2008. Vol. 3, № 1. P. 208–226.
13. Wu M., Shuai H., Cheng Q., Jiang L. Bioinspired green composite lotus fibers // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2014. Vol. 126, № 14. P. 3426–3429.
14. Wang J., Lin L., Cheng Q., Jiang L. A strong bio-inspired layered PNIPAM-clay nanocomposite hydrogel // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2012. Vol. 51, № 19. P. 4676–4680.
15. Tang Z., Kotov N. A., Magonov S., Ozturk B. Nanostructured artificial nacre // *Nat. Mater.* 2003. Vol. 2, № 6. P. 413–418.
16. Rubner M. Synthetic sea shell // *Nature.* 2003. Vol. 423, № 6943. P. 925–926.
17. Boskey A. L. Matrix Proteins and Mineralization : An Overview // *Connect. Tissue Res.* 1996. Vol. 35, № 1–4. P. 357–363.
18. Heywood B. R., Mann S. Template-directed nucleation and growth of inorganic materials // *Adv. Mater.* 1994. Vol. 6, № 1. P. 9–20.
19. Cheng Q., Jiang L., Tang Z. Bioinspired layered materials with superior mechanical performance // *Acc. Chem. Res.* 2014. Vol. 47, № 4. P. 1256–1266.
20. Cheng Q., Li M., Jiang L., Tang Z. Bioinspired layered composites based on flattened double-walled carbon nanotubes // *Adv. Mater.* 2012. Vol. 24, № 14. P. 1838–1843.
21. Wang J., Cheng Q., Lin L., Jiang L. Synergistic toughening of bioinspired poly(vinyl alcohol)-clay- nanofibrillar cellulose artificial nacre // *ACS Nano.* 2014. Vol. 8, № 3. P. 2739–2745.
22. Yao H. B., Fang H. Y., Tan Z. H., Wu L. H., Yu S. H. Biologically inspired, strong, transparent, and functional layered organic-inorganic hybrid films // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2010. Vol. 49, № 12. P. 2140–2145.
23. Yao H.-B., Fang H.-Y., Wang X.-H., Yu S.-H. Hierarchical assembly of micro-/nano-building blocks: bio-inspired rigid structural functional materials // *Chem. Soc. Rev.* 2011. Vol. 40, № 7. P. 3764.
24. Yao H.-B., Ge J., Mao L.-B., Yan Y.-X., Yu S.-H. 25th Anniversary Article: Artificial Carbonate Nanocrystals and Layered Structural Nanocomposites Inspired by Nacre : Synthesis, Fabrication and Applications // *Adv. Mater.* 2014. Vol. 26, № 1. P. 163–188.



25. Wang J., Cheng Q., Tang Z. Layered nanocomposites inspired by the structure and mechanical properties of nacre // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41, № 3. P. 1111–1129.
26. Cui W., Li M., Liu J., Wang B., Zhang C., Jiang L., Cheng Q. A strong integrated strength and toughness artificial nacre based on dopamine cross-linked graphene oxide // *ACS Nano.* 2014. Vol. 8, № 9. P. 9511–9517.
27. Xu A.-W., Ma Y., Cölfen H. Biomimetic mineralization // *J. Mater. Chem.* 2007. Vol. 17, № 5. P. 415–449.
28. Goffin A. J. J., Rajadas J., Fuller G. G. Interfacial Flow Processing of Collagen // *Langmuir.* 2010. Vol. 26, № 5. P. 3514–3521.
29. Wan S., Li Y., Peng J., Hu H., Cheng Q., Jiang L. Synergistic toughening of graphene oxide-molybdenum disulfide-thermoplastic polyurethane ternary artificial nacre // *ACS Nano.* 2015. Vol. 9, № 1. P. 708–714.
30. Yao H. Bin, Mao L. B., Yan Y. X., Cong H. P., Lei X., Yu S. H. Gold nanoparticle functionalized artificial nacre: Facile in situ growth of nanoparticles on montmorillonite nanosheets, self-assembly, and their multiple properties // *ACS Nano.* 2012. Vol. 6, № 9. P. 8250–8260.
31. Yao H.-B., Wu L.-H., Cui C.-H., Fang H.-Y., Yu S.-H. Direct fabrication of photoconductive patterns on LBL assembled graphene oxide/PDDA/titania hybrid films by photothermal and photocatalytic reduction // *J. Mater. Chem.* 2010. Vol. 20, № 25. P. 5190.
32. Cölfen H., Mann S. Higher-Order Organization by Mesoscale Self-Assembly and Transformation of Hybrid Nanostructures // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2003. Vol. 42, № 21. P. 2350–2365.
33. Smith L. Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry // *Local Gov. Stud.* 2005. Vol. 31, № 4. P. 511–526.
34. Arakaki A., Shimizu K., Oda M., Sakamoto T., Nishimura T., Kato T. Biomineralization-inspired synthesis of functional organic/inorganic hybrid materials : organic molecular control of self-organization of hybrids // *Org. Biomol. Chem.* 2015. Vol. 13, № 4. P. 974–989.
35. Mahamid J., Addadi L., Weiner S. Crystallization pathways in bone // *Cells Tissues Organs.* 2011. Vol. 194, № 2–4. P. 92–97.
36. Li Y., Asadi A., Monroe M. R., Douglas E. P. pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro : Electrostatic interactions and phosphate binding // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier B. V.* 2009. Vol. 29, № 5. P. 1643–1649.
37. Zaera F. Surface chemistry at the liquid/solid interface // *Surf. Sci.* 2011. Vol. 605, № 13–14. P. 1141–1145.
38. Knoll W. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1998. Vol. 49, № 1. P. 569–638.
39. Nudelman F., Chen H. H., Goldberg H.A., Weiner S., Addadi L. Spiers Memorial Lecture : Lessons from biomineralization : comparing the growth strategies of mollusc shell prismatic and nacreous layers in *Atrina rigida* // *Faraday Discuss.* 2007. Vol. 136. P. 9.
40. Rousseau M., Lopez E., Stempflié P., Brendlé M., Franke L., Guette A., Naslain R., Bourrat X. Multiscale structure of sheet nacre // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26, № 31. P. 6254–6262.
41. Addadi L., Weiner S. Biomineralization: mineral formation by organisms // *Phys. Scr.* 2014. Vol. 89, № 9. P. 098003.
42. Addadi L., Joester D., Nudelman F., Weiner S. Mollusk shell formation : A source of new concepts for understanding biomineralization processes // *Chem. – A Eur. J.* 2006. Vol. 12, № 4. P. 980–987.
43. Vidavsky N., Addadi S., Mahamid J., Shimoni E., Ben-Ezra D., Shpigel M., Weiner S., Addadi L. Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111, № 1. P. 39–44.
44. Mahamid J., Sharir A., Addadi L., Weiner S. Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish : Indications for an amorphous precursor phase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, № 35. P. 12748–12753.
45. Seidl B., Huemer K., Neues F., Hild S., Epple M., Ziegler A. Ultrastructure and mineral distribution in the tergite cuticle of the beach isopod *Tylos europaeus* Arcangeli, 1938 // *J. Struct. Biol.* 2011. Vol. 174, № 3. P. 512–526.
46. Xie L., Zhu F., Zhou Y., Yang C., Zhang R. Molecular Approaches to Understand Biomineralization of Shell Nacreous Layer. Berlin ; Heidelberg : Springer, 2011. 352 p.
47. Weiner S. Biomineralization : A structural perspective // *J. Struct. Biol.* 2008. Vol. 163, № 3. P. 229–234.
48. Weiner S. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect // *Rev. Mineral. Geochem.* 2003. Vol. 54, № 1. P. 1–29.
49. Cheng Q., Wu M., Li M., Jiang L., Tang Z. Ultratough Artificial Nacre Based on Conjugated Cross-linked Graphene Oxide // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2013. Vol. 52, № 13. P. 3750–3755.
50. Weiss I.M., Tuross N., Addadi L., Weiner S. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite // *J. Exp. Zool.* 2002. Vol. 293, № 5. P. 478–491.
51. Currey J. D. Mechanical Properties of Mother of Pearl in Tension // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 1977. Vol. 196, № 1125. P. 443–463.
52. Currey J. D., Zioupos P., Peter D., Casinos A. Mechanical properties of nacre and highly mineralized bone // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2001. Vol. 268, № 1462. P. 107–111.
53. Elliott D. Structure and function of mammalian tendon // *Biol. Rev.* 1965. Vol. 40, № 3. P. 392–421.
54. Riley G. Tendinopathy : from basic science to treatment // *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2008. Vol. 4, № 2. P. 82–89.
55. Jackson A.P., Vincent J. F. V., Turner R. M. The Mechanical Design of Nacre // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 1988. Vol. 234, № 1277. P. 415–440.
56. Nudelman F., Gotliv B. A., Addadi L., Weiner S. Mollusk shell formation : Mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre // *J. Struct. Biol.* 2006. Vol. 153, № 2. P. 176–187.
57. Deville S. Freezing as a Path to Build Complex Composites // *Science.* 2006. Vol. 311, № 5760. P. 515–518.
58. Becker A., Ziegler A., Epple M. The mineral phase in the cuticles of two species of Crustacea consists of magnesium calcite, amorphous calcium carbonate, and amorphous calcium phosphate // *Dalt. Trans.* 2005. № 10. P. 1814.
59. Burghard Z., Tucic A., Jeurgens L. P. H., Hoffmann R. C., Bill J., Aldinger F. Nanomechanical Properties of Bioinspired Organic–Inorganic Composite Films // *Adv. Mater.* 2007. Vol. 19, № 7. P. 970–974.



60. Katti K. S., Katti D. R., Pradhan S. M., Bhosle A. Platelet interlocks are the key to toughness and strength in nacre // *J. Mater. Res.* 2005. Vol. 20, № 5. P. 1097–1100.
61. Currey J. D. The design of mineralised hard tissues for their mechanical functions // *J. Exp. Biol.* 1999. Vol. 202, № 2. P. 3285–3294.
62. Weiner S., Traub W., Wagner H.D. Lamellar bone : Structure-function relations // *J. Struct. Biol.* 1999. Vol. 126, № 3. P. 241–255.
63. Evans J. S. “Tuning in” to Mollusk Shell Nacre- and Prismatic-Associated Protein Terminal Sequences. Implications for Biomineralization and the Construction of High Performance Inorganic–Organic Composites // *Chem. Rev.* 2008. Vol. 108, № 11. P. 4455–4462.
64. Yao H. Bin, Tan Z. H., Fang H. Y., Yu S. H. Artificial nacre-like bionanocomposite films from the self-assembly of chitosan-montmorillonite hybrid building blocks // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2010. Vol. 49, № 52. P. 10127–10131.
65. Gehrke N., Nassif N., Pinna N., Antonietti M., Gupta H. S., Cölfen H. Retrosynthesis of nacre via amorphous precursor particles // *Chem. Mater.* 2005. Vol. 17, № 26. P. 6514–6516.
66. Nishimura T., Imai H., Oaki Y., Sakamoto T., Kato T. Preparation of Thin-film Hydroxyapatite/Polymer Hybrids // *Chem. Lett.* 2011. Vol. 40, № 5. P. 458–460.
67. Kato T., Sugawara A., Hosoda N. Calcium Carbonate–Organic Hybrid Materials // *Adv. Mater.* 2002. Vol. 14, № 12. P. 869.
68. Zolotoyabko E., Pokroy B. Biomineralization of calcium carbonate: structural aspects // *Cryst. Eng. Comm.* 2007. Vol. 9, № 12. P. 1156.
69. Hosoda N., Sugawara A., Kato T. Template effect of crystalline poly(vinyl alcohol) for selective formation of aragonite and vaterite CaCO₃ thin films // *Macromolecules.* 2003. Vol. 36, № 17. P. 6449–6452.
70. Nishimura T., Ito T., Yamamoto Y., Yoshio M., Kato T. Macroscopically Ordered Polymer/CaCO₃ Hybrids Prepared by Using a Liquid-Crystalline Template // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2008. Vol. 47, № 15. P. 2800–2803.
71. Veis A. Mineralization in Organic Matrix Frameworks // *Rev. Mineral. Geochem.* 2003. Vol. 54, № 1. P. 249–289.
72. Zuo S., Wei Y. Microstructure observation and mechanical behavior modeling for limnetic nacre // *Acta Mech. Sin.* 2008. Vol. 24, № 1. P. 83–89.
73. Meldrum F. C. Calcium carbonate in biomineralisation and biomimetic chemistry // *Intern. Mater. Rev.* 2003. Vol. 48, № 3. P. 187–224.
74. Olszta M. J., Odom D. J., Douglas E. P., Gower L. B. A New Paradigm for Biomineral Formation: Mineralization via an Amorphous Liquid-Phase Precursor // *Connect. Tissue Res.* 2003. Vol. 44, № 1. P. 326–334.
75. Lakes R. Materials with structural hierarchy // *Nature.* 1993. Vol. 361, № 6412. P. 511–515.
76. Lapcik L. J., Smedt S. de, Lapcik L., Demeester J., Chabreck P. Hyaluronan : Preparation, Structure, Properties and Applications // *Chem. Rev.* 1998. Vol. 88, № 3. P. 2663–2681.

Prospects for the Development of Biomimetic Hybrid Materials Based on the Layer-by-Layer Assembly Technique

A. V. Ermakov, S. B. Venig

Alexey V. Ermakov, <https://orcid.org/0000-0001-8105-5932>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ermakov.ssu@gmail.com

Sergey B. Venig, <https://orcid.org/0000-0002-4759-5828>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, sergey.venig@gmail.com

Natural composite structures, such as horn bones and nacre (or so-called mother-of-pearl), are characterized by a structural organization ordered at the nanoscale. This material architecture has attracted a wide interest order to develop new hybrid composite materials with tunable mechanical properties. The current review aimed to establish the prospects for the development of artificial methods for synthesis of mechanically strong biomimetic materials. In this paper, we provide a review on the current understanding of fundamental principles of the formation, the structure and properties of natural biomineralized composite materials, as well as a review of the results of synthetic routes for the synthesis of such materials, including sequential infiltration. In this approach calcium carbonate particles are supposed to be nucleated and grow within polymeric films, obtained via Layer-by-Layer (LbL) assembly technique. The important role of polymer matrices in combination with unique capabilities of LbL assembly technique in control over the film composition opens up a wide range of possibilities for synthesis of artificial composite films with unique mechanical characteristics. Since growth of inorganic phase is strongly determined by the nature of polymers in the matrix, the possibility of LbL technique to control the composition in nanoscale opens up a way to tune the mineralization process. Considering high biocompatibility of such materials this approach can find wide range of applications including tissue engineering and drug delivery systems.

Key words: biomineralization, composites, polymers, calcium carbonate.

Образец для цитирования:

Ермаков А. В., Вениг С. Б. Перспективы развития биоподобных гибридных материалов на основе метода полиионной сборки // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2018. Т. 18, вып. 4. С. 383–389. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-383-389>

Cite this article as:

Ermakov A. V., Venig S. B. Prospects for the Development of Biomimetic Hybrid Materials Based on the Layer-by-Layer Assembly Technique. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 383–389 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-383-389>



УДК 544.723:665.61

ПОЛУЧЕНИЕ НЕФТЕСОРБЕНТОВ ИЗ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Е. С. Свешникова



Свешникова Елена Станиславовна, кандидат технических наук, доцент кафедры нефтехимии и техногенной безопасности Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, elena-sveshnikova@yandex.ru

Предложен способ получения перспективного целлюлозосодержащего нефтесорбента на основе оболочки гречихи и оболочки проса, предполагающий его модификацию структурирующими полимер соединениями, с последующей термообработкой. Данные методы модификации способствуют созданию углеродных структур с заданной пористостью, а также повышению выхода карбонизованных структур после термообработки. Исследованы сорбционные свойства материалов, полученных на основе модифицированного растительного сырья. Показано, что температура и время выдерживания при термообработке влияют на размер частиц, площадь поверхности, объем и радиус пор. Наиболее развитая поверхность и более высокая сорбционная способность достигается при температуре 350–450 °С и при времени термообработки 1–2 минуты (4,7 г/г для оболочки гречихи и 6,0 г/г для оболочки проса по отработанному моторному маслу; и 4,3 г/г для оболочки гречихи и 5,0 г/г для оболочки по нефти). Полученные сорбенты имеют хороший запас плавучести (~20 дней), что очень важно при использовании материалов для сбора нефтепродуктов с поверхности воды. Доказана возможность использования оболочки гречихи и проса в качестве эффективного сорбента нефти и нефтепродуктов.

Ключевые слова: физическая и химическая модификация, оболочка обмолота проса, оболочка обмолота гречихи, параметры, структурные показатели, нефтеемкость, плавучесть, свойства.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-390-392>

Разработка инновационных технологий комплексной переработки растительных и минеральных ресурсов позволяет использовать исходное сырье для создания функциональных материалов.

На сегодняшний день самое широкое применение в различных областях промышленности находят углеродные материалы. Для их промышленного изготовления используются различные целлюлозосодержащие растительные отходы, ископаемые угли, торф и т.д.

Применение же в качестве сырья возобновляемых отходов сельскохозяйственного производства связано с возможностью использования местного сырья, сокращающего затраты на его доставку; низкой стоимостью и доступностью,

сохранением свойств сырья при хранении; отсутствием сточных вод и затрат на их утилизацию.

Для очистки воды от нефтеразливов могут применяться различные природные углеродсодержащие сорбенты на основе торфа, кокосовой стружки, мха, соломы, шерсти, размолотой кукурузной лузги, рисовой шелухи, древесных отходов и т.п. [1–6]. Обладая такими свойствами, как высокая пористость, низкая себестоимость, возобновляемость, не составляют исключение оболочки проса и гречихи. Применение таких материалов экологично ввиду естественности происхождения, а также легкости утилизации после насыщения их нефтепродуктами в качестве, например, топливных брикетов, также они могут быть подвергнуты вторичной переработке. Однако наряду с преимуществами данные материалы имеют ряд недостатков, таких, например, как высокая гидрофильность, малая сорбционная способность, низкий запас плавучести. Устранение этих недостатков достигается путём применения различных методов модификации [7].

В работе исследованы оболочки, полученные при обмолоте проса (ОП) и гречихи (ОГ). Модификацию оболочек проводили с использованием соединений, содержащих в своем составе элементы, способные структурировать целлюлозосодержащие полимеры, обеспечивая повышенный выход карбонизованных структур при воздействии на полимер повышенных температур.

Количество поглощенного сорбентом вещества зависит прежде всего от структуры и свойств сорбента. Увеличение площади поверхности может быть достигнуто различными методами, наиболее распространенными из них являются измельчение, увеличение пористости и грануляция.

Для достижения более развитой поверхности и повышения выхода готового сорбента проводили химическую и физическую модификацию: обработку оболочки 30%-ным водным раствором тетрафторбората аммония (ТФБА), при модуле ванны –2, с последующей сушкой при температуре 85±5 °С. Выбор в качестве модифицирующей добавки ТФБА был обусловлен ещё и тем фактом, что исходя из данных термо-



гравиметрии разложение ТФБА происходит с потерями массы 98% в диапазоне температур 230–365 °С. Таким образом, достигается не только увеличение выхода готового продукта в 2–4 раза в сравнении с немодифицированной оболочкой, но и полное отсутствие модификатора

в составе материала после его термообработки.

С целью подбора оптимального режима модификации исследовались параметры пористой структуры модифицированной оболочки (МО) при различных температурах термообработки (табл. 1).

Таблица 1

Влияние температуры термообработки на структурные показатели

Образец	ОП	ОП+ТФБА, °С				ОГ	ОГ+ТФБА, °С			
	Исх	250	350	400	450	Исх	250	350	400	450
Площадь поверхности, м ² /г	0,25	6,7	77,0	0,2	0,04	0,3	6,4	67,0	80,2	61,0
Объем пор, см ³ /г	0,000	0,02	0,74	0,004	0,001	0,000	0,021	0,68	0,54	0,36
Радиус пор, Å	25	15	80	479	485	2,7	2,9	10,8	14,9	18,3

Как известно, размер молекул смеси углеводородов составляет от 4 до 10 нм, поэтому больший размер пор сорбента снижает сорбционную способность в результате преобладания в материале процессов десорбции над процессами сорбции, а меньший – не позволит нефти проникнуть в объём сорбента [7].

Исходя из данных табл. 1, наиболее развитая поверхность достигается при термообработке модифицированных оболочек в диапазоне температур 350–450 °С. При данных температурах термообработки увеличивается объём пор, но одновременно отмечено и увеличение радиуса

пор. При более высоких температурах, видимо, протекают процессы деструкции, приводящие к уменьшению размеров частиц и изменению их структуры.

Исследования длительности термообработки показали, что с увеличением времени выдержки оболочки при заданной температуре снижается сорбционная способность материала по нефти и отработанному моторному маслу (табл. 2). Данный факт свидетельствует о преобладании процессов десорбции над процессами сорбции ввиду увеличения размера пор в материале.

Таблица 2

Влияние длительности термообработки на сорбционную способность модифицированной оболочки (ОГ/ОП)

Температура термообработки, °С	Продолжительность термообработки, мин				
	1	3	5	7	10
Сорбционная способность по нефти, г/г					
350	4,7/6,0	3,5/5,5	3,3/4,2	3,2/3,6	3,0/3,3
Сорбционная способность по отработанному моторному маслу, г/г					
350	4,3/5,0	3,7/4,3	3,1/3,8	2,8/3,1	2,4/2,7

Примечание. При толщине слоя нефтепродукта 5 мм.

При использовании материалов для сбора загрязнителей с поверхности воды значительна роль такого показателя, как плавучесть. Запаса плавучести должно хватать до завершения операции сбора отработанного сорбента. Исследования показали, что после сорбции нефти и отработанного моторного масла модифицированные оболочки сохраняют плавучесть более 20 сут, исключение составляет лишь оболочка,

термообработанная при температуре 500 °С.

Таким образом, проведено комплексное изучение процессов сорбции нефтепродуктов разработанными сорбентами на основе МО. Доказана зависимость их сорбционной способности от режимов модификации (температуры и длительности термообработки). Показана возможность использования разработанных сорбентов на водной поверхности с сохранением плавучести.



Список литературы

1. Сазбайда Н. А., Ольшанская Л. Н., Кутунова К. Н., Манарова Ю. А. Использование отходов производства в качестве сорбентов нефтепродуктов // Экология и промышленность России. 2009. № 1. С. 36–38.
2. Онищенко Д. В., Чаков В. В. Возобновляемое растительное сырье как основа для получения функциональных нанокompозитных материалов универсального назначения // Журн. прикладной химии. 2011. Т. 84, вып. 9. С. 1562–1566.
3. Хлесткин Р. Н., Самойлов Н. А. О ликвидации разливов нефти при помощи растительных отходов // Нефтяное хозяйство. 2000. № 7. С. 84–85.
4. Dedov A. V. A complex sorbent for absorption of petroleum products based on a nonwoven material and thermally expanded graphite // Chemistry and Technology of Fuels and Oils. 2006. Vol. 42, № 1. P. 75–77.
5. Bayat A., Aghamiri S. F., Moneb A., Vakili-Nezhaad C. R. Oil spill cleanup from sea water by sorbent materials // Chemical Engineering & Technology. 2005. Vol. 28, № 12. P. 1525–1528.
6. Передерий М. А., Кураков Ю. И., Маликов И. Н., Молчанов С. В. Сорбция нефтепродуктов углеродными сорбентами // Химия твердого топлива. 2009. № 5. С. 42–46.
7. Еремеева Н. М., Нефёдова К. О., Свешникова Е. С., Панова Л. Г. Исследование структуры, свойств и сорбционной активности углеродсодержащих сорбентов на основе целлюлозосодержащих продуктов // Хим. пром-сть сегодня. 2015. № 5. С. 51–56.

Receiving Oil Sorbents from Renewable Agricultural Raw Materials

E. S. Sveshnikova

Elena S. Sveshnikova, <https://orcid.org/0000-0002-4570-0655>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, elena-sveshnikova@yandex.ru

A method is proposed for obtaining a promising cellulose-containing oil sorbent based on the buckwheat shell and millet shell, suggesting its modification by compounds structuring the polymer followed by heat treatment. These modification methods contribute to the creation of carbon structures with controlled porosity, as well as an increase in the yield of carbonized structures after heat treatment. Sorption properties of materials based on modified plant raw materials are investigated. It is shown, that the temperature and the exposure time during heat treatment affect the particle size, surface area, volume and pore size. The highest surface area and higher sorption capacity, is achieved at a temperature of 350–450°C and with a heat treatment time of 1–2 minutes (4.7 g/g for exhaust gas and 6.0 g/g for OP for oil, 4.3 g/g for exhaust gas and 5.0 g/g for OP). The resulting sorbents have a good buoyancy reserve (~20 days), which is very important when using materials to collect contaminants from the water surface. The possibility of using the buckwheat shell and millet shell as an effective sorbent of oil and oil products, has been proved.

Key words: physical and chemical modification, millet threshing shell, buckwheat threshing shell, parameters, structural parameters, oil capacity, buoyancy, properties.

Образец для цитирования:

Свешникова Е. С. Получение нефтесорбентов из возобновляемого сельскохозяйственного сырья // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 390–392. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-390-392>

Cite this article as:

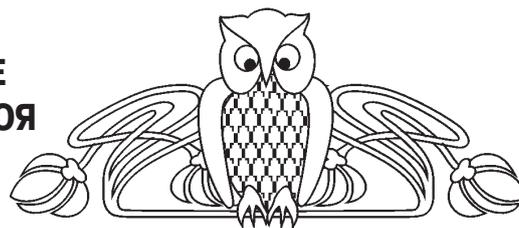
Sveshnikova E. S. Receiving Oil Sorbents from Renewable Agricultural Raw Materials. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 390–392 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-390-392>



УДК 539.233+544.023.221

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СУБФАЗЫ И ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА ЛЕНГМЮРОВСКОГО МОНОСЛОЯ

М. М. Кассим, В. А. Горячева,
А. Ж. Аль-Алвани, Е. Г. Глуховской



Кассим Муханнад Махмуд, аспирант факультета нано- и биомедицинских технологий, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, muhannad.qassim@yahoo.com

Горячева Виктория Алексеевна, магистрант Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, goryacheva_viktoria@mail.ru

Аль-Алвани Аммар Жабер, аспирант факультета нано- и биомедицинских технологий, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ammarhamlet2013@yahoo.com

Глуховской Евгений Геннадьевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры материаловедения, технологии и управления качеством факультета нано- и биомедицинских технологий, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, glukhovskoy@gmail.com

Проведено исследование специфики формирования монослоев арахидоновой кислоты (применяемых в качестве моделей клеточных мембран) по методу Ленгмюра на субфазе, содержащей в своем составе *L*-аскорбиновую и *D*-изоаскорбиновую кислоты с концентрацией 10^{-2} , 10^{-3} М при температуре 25, 37 и 41°C. Экспериментально обнаружено влияние изоформы аскорбиновой кислоты, состава и температуры субфазы на механические свойства монослоев (удельная площадь, сжимаемость, давление коллапса). Отмечено, что при введении в состав субфазы аскорбиновой кислоты наблюдается смещение изотерм сжатия в область больших значений удельной площади монослоя; аналогичный сдвиг происходит и при повышении концентрации и температуры субфазы. Приведены численные значения основных параметров для монослоев изучаемых систем, рассчитанные в жидко-конденсированном и твердо-кристаллическом состояниях. Выдвинуто предположение об адсорбции аскорбиновой кислоты из объема субфазы на поверхности монослоя за счет образования водородных связей. Данное исследование может быть полезно для понимания процессов модификации клеточных мембран под влиянием *L*- и *D*-изоформ аскорбиновой кислоты: изменения подвижности компонентов, входящих в состав мембраны, ее пластичности, жесткости и др.

Ключевые слова: *L*-аскорбиновая кислота, *D*-изоаскорбиновая кислота, арахидоновая кислота, монослои Ленгмюра, техника Ленгмюра–Блоджетт, изотермы сжатия, поверхностное натяжение, мембрана.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-393-398>

Введение

Ленгмюровские монослои являются хорошо воспроизводимыми мономолекулярными 2D-структурами, позволяющими не только обнаружить активность отдельных мембранных компонентов, но и количественно оценить степень их активности, изучить взаимодействие между ними, влияние их на структурные, механические и др. свойства мембран живых клеток. В работах [1–3] авторы предложили и апробировали ряд уникальных способов определения степени замещения металлом атома водорода в полярных частях молекул жирных кислот, основанных на анализе изотерм сжатия.

Основу биологических мембран составляет двойной слой молекул – фосфолипидов, гликолипидов и холестерина. В мембранах различного происхождения относительное массовое содержание липидов колеблется от 25 до 75% по отношению к белку. Но даже в случае относительно небольшого содержания молекулы липидов благодаря своему строению способны формировать довольно прочную и стабильную 2D-кристаллическую матрицу, в которую встраиваются все другие молекулы и комплексы.

Структура и фазовые состояния молекул липидов на поверхности воды существенно зависят от степени их сжатия [1]. Последовательность фазовых трансформаций монослоев особенно ярко проявляется на изотермах сжатия и зависит не только от природы ПАВ и внешних условий, но и от специфики взаимодействия молекул монослоя с компонентами водной субфазы – молекулами полимеров, белков, нуклеиновых кислот, молекулярными кластерами, наночастицами и др. [4]. Самые чувствительные параметры, которые легко регистрируются и рассчитываются по изотермам сжатия, – это модуль сжатия, сжимаемость и давление коллапса [5–7], изменение которых позволяет не только подтверждать факты межмолекулярного взаимодействия, но и оценивать его количественно.

Высокая чувствительность таких параметров стала основанием для изучения различия



во взаимодействии различных изоформ аскорбиновой кислоты (АК) с молекулами монослоя.

Физиологическое действие аскорбиновой кислоты *L*-формы, известной также как витамин С, очень обширно. Она выступает как противораковый фактор, способствует процессам регенерации тканей, участвует в формировании коллагена, *L*-карнитина, некоторых нейротрансмиттеров, повышает стрессоустойчивость, иммунитет и прочность стенок капилляров. АК также участвует в метаболизме белков и выполняет важные функции в физиологическом антиоксидантном механизме путем регенерации других антиоксидантов в организме, включая альфа-токоферол (витамин Е) [8–11].

Известны 4 изоформы аскорбиновой кислоты. В промышленности выпускаются только *L*-аскорбиновая кислота (*L*-АК) и ее диастереомер *D*-изоаскорбиновая кислота (*D*-изоАК), структурные формулы которых представлены на рис. 1. Строение молекул обуславливает различия в физико-химических свойствах, реакционной способности и областях применения АК.

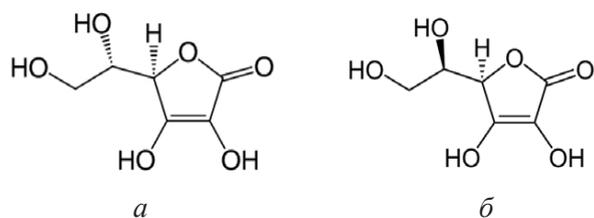


Рис. 1. Структурные формулы изоформ аскорбиновой кислоты: *a* – *L*-АК; *b* – *D*-изоАК

L-АК часто применяется как вспомогательное средство при лечении инфекционных болезней, лучевой болезни, нефрита, заболеваний сердца, печени, легких, пищеварительного тракта, а также при отравлении тяжелыми металлами.

D-изоАК является синтетическим изомером АК, не проявляет витаминную активность, однако используется в качестве пищевой добавки Е315 во многих продуктах питания.

АК активно переносится в организм через две изоформы натрий-зависимых транспортеров: SVCT1 и SVCT2 (sodium-dependent vitamin C transporter) [12, 13]. Оба транспортера проявляют значительно большее сродство к *L*-АК в сравнении с *D*-изоАК [12, 14]. Эта селективность, вероятно, объясняет более ранние наблюдения значительно меньшего накопления в тканях и более низкой антиоксидантной активности *D*-изоАК у морских свинок [15, 16]. Хотя *D*-изоАК обычно является добавленным

пищевым консервантом [17], совместное содержание в организме обеих изоформ не влияет на биодоступность *L*-АК у людей [18].

Влияние различных форм аскорбиновой кислоты на процессы жизнедеятельности клеток невозможно рассматривать в отрыве от проблем взаимодействия молекул АК с клеточными мембранами. Поскольку такие эксперименты осложнены спецификой работы с живыми клеточными культурами, исследование механизмов взаимодействия часто проводят на физических моделях клеточных мембран – монослоях Ленгмюра.

Целью настоящей работы явились оценка влияния состава субфазы и внешних условий на формирование и свойства ленгмюровского монослоя, определение основных параметров монослоя и анализ межмолекулярного взаимодействия молекул арахидиновой кислоты с молекулами аскорбиновой кислоты различных изоформ.

Экспериментальная часть

Для формирования и исследований монослоев Ленгмюра в качестве поверхностно-активного вещества использовали арахидиновую кислоту (АрК) производства «Sigma Aldrich» с содержанием основного компонента 99% по массе. На основе этого ПАВ готовили раствор в хлороформе категории ХЧ, производства АО «Экос-1», с массовой долей основного вещества 99,0–99,4%. Концентрация раствора составляла $C_{\text{АрК}} = 10^{-3}$ М.

Для приготовления субфазы использовалась деионизованная вода с удельным сопротивлением 18,2 МОм × см, прошедшая многоступенчатую очистку системой водоподготовки Smart2Pure 3 Standard (производство «Thermo Scientific»), и аскорбиновая кислота: *L*-АК производства ЗАО «ФП Мелиген» (с массовой долей основного вещества 99%) и *D*-изоАК производства «Химреактив» (с массовой долей основного вещества 98%). Концентрация растворов составляла $C_{\text{АК}} = 10^{-2}$, 10^{-3} М. Для каждого эксперимента использовался свежеприготовленный раствор АК.

Для формирования монослоев и записи изотерм сжатия использовалась ленгмюровская ванна KSV-Nima LB Through Medium KN 2002. После проведения стандартных процедур подготовки ванны к работе, включая выход в необходимый режим термостатирования, очистку рабочей зоны и калибровку датчика поверхностного натяжения, на поверхность водной субфазы вносили по каплям 70 мкл раствора АрК в хлороформе. Эмпирически в предварительных экспериментах было установлено,



что для используемых значений концентрации АрК и геометрии ванны именно такой объем позволяет формировать истинный монослой, когда лежащие на поверхности воды молекулы после испарения растворителя практически не взаимодействуют друг с другом (т.е. монослой находится в 2D-газовой фазе). После внесения раствора на поверхность субфазы выдерживали 5 мин для полного испарения хлороформа и установления равновесного состояния между монослоем и водной субфазой. Затем монослой сжимался подвижными барьерами с постоянной скоростью уменьшения площади – 10 мм/мин.

Эксперимент проводили при температуре 25, 37 и 41°C. Значение поддерживалось постоянным с помощью лабораторного термостата LOIP LT-105a с точностью 1°C.

Для анализа межмолекулярного взаимодействия определялись удельная площадь A_0 (\AA^2), сжимаемость K ($[\text{мН/м}]^{-1}$) монослоев, а также давление коллапса для твердо-кристаллического (SS) и жидко-конденсированного состояний (L2 или LS), определяемых согласно классификации [5, 19]. Параметр «сжимаемость монослоя» определялся по формуле

$$K = - \frac{1}{A_0} \cdot \left(\frac{dA}{d\pi} \right).$$

Результаты и их обсуждение

Зависимости поверхностного давления π (мН/м) от площади поверхности, приходящейся на одну молекулу АрК A_0 (\AA^2), для изучаемых систем и основные параметры, рассчитанные в жидко-конденсированном и твердокристаллическом состояниях, представлены на рис. 2 и в таблице.

Для упрощения обсуждения результатов введем следующие сокращенные обозначения субфаз: деионизованная вода без каких-либо добавок – далее «тест-субфаза», субфаза с добавками L-АК или D-изоАК – далее, соответственно, «L-субфаза» или «D-субфаза».

Видно, что в присутствии аскорбиновой кислоты происходит ожидаемый небольшой сдвиг изотерм сжатия в сторону больших значений A_0 относительно «тест-субфазы», что объясняется увеличением заряда полярных частей молекул ПАВ в результате смещения кислотности субфазы и усилением их расталкивания силами кулоновского взаимодействия. Кроме того, за счет образования водородных связей между полярной –COOH группой молекул АрК и –ОН группами АК может происходить дополнительный сдвиг изотерм сжатия в область больших значений удельных площадей при повышении концентрации АК в субфазе.

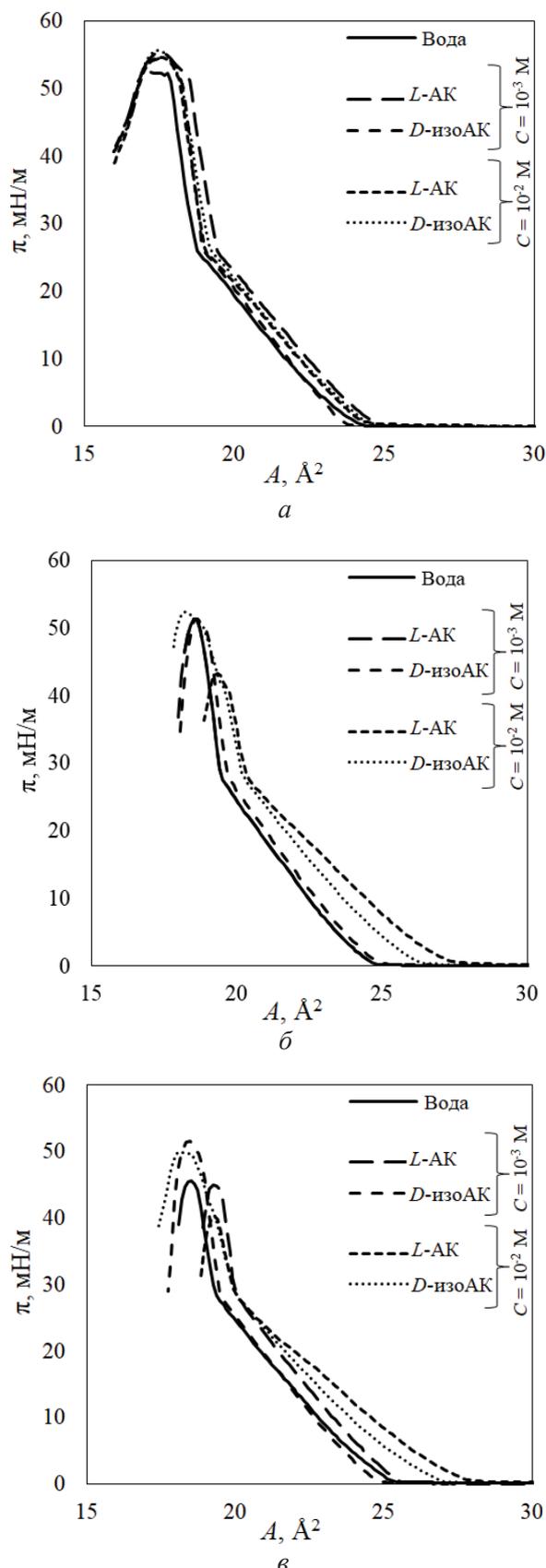


Рис. 2. Изотермы сжатия монослоев АрК на L- и D-субфазе при температуре, °C: а – 25, б – 37, в – 41

Значения удельной площади на молекулу монослоя A_0 , сжимаемости монослоя K и давления коллапса π_k в LS- и SS-состояниях

Вещество	C, М	T, °C	π_k (мН/м)	LS-состояние		SS-состояние	
				$A_0, \text{Å}^2$	$K, (\text{мН/м})^{-1}$	$A_{02}, \text{Å}^2$	$K_2, (\text{мН/м})^{-1}$
D-изоАК	0,001	25	54,32	22,39	-0,37	18,54	-2,03
	0,01		55,66	24,47	-0,30	18,98	-1,33
	0,001	37	51,32	24,18	-0,32	20,40	-2,03
	0,01		52,38	24,60	-0,26	21,58	-1,32
	0,001	41	51,52	24,60	-0,26	20,82	-1,70
	0,01		49,98	25,62	-0,23	21,45	-1,07
L-АК	0,001	25	55,38	22,35	-0,39	18,34	-2,10
	0,01		54,56	22,98	-0,30	18,49	-1,44
	0,001	37	51,40	24,15	-0,29	20,23	-1,92
	0,01		43,30	26,31	-0,23	21,23	-1,11
	0,001	41	44,96	24,00	-0,33	20,33	-1,75
	0,01		40,34	25,75	-0,21	22,01	-0,84
Вода	0	25	52,11	23,43	-0,33	20,09	-2,14
		37	51,42	24,03	-0,37	20,21	-2,10
		41	45,70	24,34	-0,28	20,42	-1,97

Изменение концентрации АК в субфазе также приводит к сдвигу изотерм. Сравнительный анализ изотерм монослоев, сформированных на «L-субфазе» и «D-субфазе», показывает, что для «L-субфазы» концентрационные или температурные вариации дают больший сдвиг изотерм, по сравнению с изотермой для «D-субфазы».

При повышении температуры субфазы наблюдаются следующие закономерности: значения удельных площадей в жидко-конденсированном состоянии увеличиваются, давление коллапса (когда монослой ломается и начинает формироваться многослойная структура) снижается, монослой становится менее прочным и менее жестким (участки изотерм становятся более пологими). Такие изменения свидетельствуют о совершенстве структуры монослоя, о наличии каких-либо дополнительных факторов, влияющих на его структуру и прочность, о связывании молекул монослоя с компонентами субфазы.

Сравнивая величины давлений коллапса, сжимаемости монослоев в различных фазовых состояниях, можно видеть, что совместное действие концентрационного и температурного факторов проявляется более ярко: сдвиг изотерм

монослоев для «L-субфазы» и «D-субфазы» при температуре 37 и 41°C более значительный нежели при температуре 25°C; в этих же условиях ярче проявляется разница межмолекулярного взаимодействия для изомеров L-АК и D-изоАК.

Выводы

Таким образом, присутствие в составе водной субфазы разных изоформ АК оказывает разное влияние на формирование монослоев арахиновой кислоты, которое проявляется более или менее сильно в зависимости от концентрации и температурных условий.

Полученная информация может быть полезной для понимания процессов модификации клеточных мембран под влиянием L- и D-изоформы аскорбиновой кислоты: изменения мобильности включенных в мембрану компонентов, ее пластичности – жесткости, деградации – регенерации, упорядоченности – разупорядоченности и др. изменений.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-07-00407).



Список литературы

1. Абрамзон А. А., Голоудина С. И. Об агрегатном состоянии монослоев ПАВ на поверхности жидкости // Успехи коллоидной химии : сб. ст. Л. : Химия, 1991. С. 262–291.
2. Al-Alwani A. J., Chumakov A. S., Albermani M. S., Shinkarenko O. A., Begletsova N. N., Vostrikova A. M., Gorbachev I. A., Venig S. B., Glukhovskoy E. G. Ligands exchange, studying the stability and optical properties of CdSe/CdS/ZnS quantum dots with liquid crystal // IOP Conf. Series : Journal of Physics. 2017. Vol. 917. Article id. 032026.
3. Янклович А. И. Регулярные мультимолекулярные структуры ПАВ – плёнки Ленгмюра – Блоджетт // Успехи коллоидной химии : сб. ст. Л. : Химия, 1991. С. 262–291.
4. Chumakov A. S., Al-Alwani A. J., Gorbachev I. A., Ermakov A. V., Kletsov A. A., Glukhovskoy E. G., Kazak A. V., Usol'tseva N. V., Shtykov S. N. Temperature and mixing ratio effects in the formation of CdSe/CdS/ZnS quantum dots with 4'-n-octyl-4-р-Сyanobiphenyl thin films // BioNanoScience. 2017. Vol. 7, № 4. P. 666–671.
5. Адамсон А. Физическая химия поверхностей / пер. с англ. М. : Мир, 1979. 568 с.
6. Petty Michael C. Langmuir-Blodgett Films : An Introduction. Cambridge University Press, 1996. 234 p.
7. Kim V. P., Ermakov A. V., Glukhovskoy E. G., Rakhnyanskaya A. A., Gulyaev Yu. V., Cherepenin V. A., Taranov I. V., Kormakova P. A., Potapenkov K. V., Usmanov N. N., Saletsky A. M., Koksharov Yu. A., Khomutov G. B. Planar nanosystems on the basis of complexes formed by amphiphilic polyamine, magnetite nanoparticles, and DNA molecules // Nanotechnologies in Russia. 2014. Vol. 9, № 5–6. P. 280–287.
8. Li Y., Schellhorn H. E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C // J. Nutr. 2007. Vol. 137, № 10. P. 2171–2184.
9. Carr A. C., Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans // Amer. J. Clin. Nutr. 1999. Vol. 69. P. 1086–1107.
10. Frei B., England L., Ames B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86, № 16. P. 6377–6381.
11. Jacob R. A., Sotoudeh G. Vitamin C function and status in chronic disease // Nutr. Clin. Care. 2002. Vol. 5, № 2. P. 66–74.
12. Tsukaguchi H., Tokui T., Mackenzie B., Berger U. V., Chen X. Z., Wang Y., Brubaker R. F., Hediger M. A. A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters // Nature. 1999. Vol. 399, № 6731. P. 70–75.
13. Savini I., Rossi A., Pierro C., Avigliano L., Catani M. V. SVCT1 and SVCT2 : key proteins for vitamin C uptake // Amino Acids. 2008. Vol. 34, № 3. P. 347–355.
14. Rumsey S. C., Welch R. W., Garraffo H. M., Ge P., Lu S. F., Crossman A. T., Kirk K. L., Levine M. Specificity of ascorbate analogs for ascorbate transport. Synthesis and detection of [(125)I]6-deoxy-6-iodo-L-ascorbic acid and characterization of its ascorbate-specific transport properties // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 33. P. 23215–23222.
15. Goldman H. M., Gould B. S., Munro H. N. The antiscorbutic action of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid (erythorbic acid) in the guinea pig // Amer. J. Clin. Nutr. 1981. Vol. 34, № 1. P. 24–33.
16. Hughes R. E., Hurley R. J. The uptake of D-araboascorbic acid (D-isoascorbic acid) by guinea-pig tissues // Br. J. Nutr. 1969. Vol. 23, № 2. P. 211–216.
17. Levine M. Fruits and vegetables : There is no substitute // Amer. J. Clin. Nutr. 1996. Vol. 64. P. 381–382.
18. Sauberlich H. E., Tamura T., Craig C. B., Freeberg L. E., Liu T. Effects of erythorbic acid on vitamin C metabolism in young women // Amer. J. Clin. Nutr. 1996. Vol. 64. P. 336–346.
19. Абрамзон А. А. Поверхностно-активные вещества. Л. : Химия, 1981. 304 с.

The Influence of the Composition of Subphase and External Conditions on the Formation and Properties of Langmuir Monolayer

M. M. Qassime, V. A. Goryacheva,
A. J. Al-Alwani, E. G. Glukhovskoy

Muhammad M. Qassime, <https://orcid.org/0000-0002-5972-9061>,
Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012,
Russia, muhammad.qassim@yahoo.com

Viktoria A. Goryacheva, <https://orcid.org/0000-0002-8724-1522>,
Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012,
Russia, goryacheva_viktoria@mail.ru

Ammar J. Al-Alwani, <https://orcid.org/0000-0002-5665-464X>,
Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Rus-
sia, ammarhamlet2013@yahoo.com

Evgeny G. Glukhovskoy, <https://orcid.org/0000-0002-8282-3638>,
Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012,
Russia, glukhovskoy@gmail.com

The specificity of the formation of arachinic acid monolayers (used as models of cell membranes) by the Langmuir method on a subphase containing L-ascorbic and D-isoascorbic acids with a concentration of 10⁻², 10⁻³ M at a temperature of 25, 37 and 41°C was studied. The influence of the isoforms of ascorbic acid, the composition and temperature of the subphase on the mechanical properties of monolayers (specific area, compressibility, collapse pressure) was experimentally found. It was marked that the introduction of ascorbic acid into the subphase leads to the displacement of compressibility isotherms to the region of large values of the specific area of the monolayer; a similar shift occurs with an increase of the concentration and temperature of the subphase. Numerical values of the main parameters of the



monolayers for studied systems calculated in liquid-condensed and solid-crystalline states are presented. It is suggested that the adsorption of ascorbic acid on the subphase on the surface of the monolayer is due to the formation of hydrogen bonds. This study may be useful for understanding the processes of cell membrane modification under the influence of *L*- and *D*-isoforms of ascorbic acid: changes in the mobility of the components included in the membrane, its plasticity, stiffness, etc.

Key words: *L*-ascorbic acid, erythorbic acid, arachidic acid, Langmuir monolayer, Langmuir–Blodgett technique, compression isotherm, surface tension, membrane.

Acknowledgements: *This work was supported by the Russian Foundation for Basic Researches (project no. 17-07-00407).*

Образец для цитирования:

Кассим М. М., Горячева В. А., Аль-Алвани А. Ж., Глуховской Е. Г. Влияние состава субфазы и внешних условий на формирование и свойства лэнгмюровского монослоя // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 393–398. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-393-398>

Cite this article as:

Qassime M. M., Goryacheva V. A., Al-Alwani A. J., Glukhovskoy E. G. The Influence of the Composition of Subphase and External Conditions on the Formation and Properties of Langmuir Monolayer. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 393–398 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-393-398>



БИОЛОГИЯ

УДК 579.262

О ВКЛАДЕ АГРЕГАЦИИ КЛЕТОК И ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ФОРМИРОВАНИЕ И СТАБИЛИЗАЦИЮ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Ю. А. Филиппчева, Е. М. Телешева, С. С. Евстигнеева,
А. В. Шелудько, Е. Г. Пономарева, Л. П. Петрова, Е. И. Кацы

Филиппчева Юлия Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, ljuche@yandex.ru

Телешева Елизавета Михайловна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, sentebrinka@mail.ru

Евстигнеева Стелла Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, stels20295@yandex.ru

Шелудько Андрей Вячеславович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shel71@yandex.ru

Пonomарева Елена Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, ponomareva_e@ibppm.ru

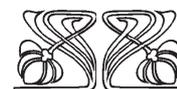
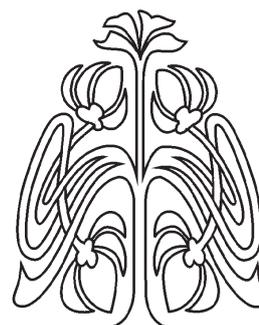
Петрова Лилия Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, petrova_lp@mail.ru

Кацы Елена Ильинична, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, ei_katsy@mail.ru

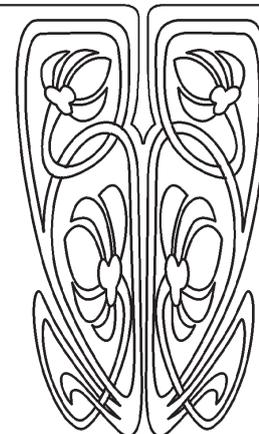
Имеется мало данных о функциях основных компонентов матрикса и роли разнообразных структур клеточной поверхности в образовании и стабилизации биопленок азоспирилл. Известно, что по сравнению со штаммом *A. brasilense* Sp245 его дефектные по сборке жгутиков мутанты по генам *flhB*, *fabG1* или *mmsB1* хуже формируют биопленки. В данной работе сравнивали агрегацию бактерий и формирование ими биопленок, действие ДНКазы на биопленки. Результаты исследований показали, что агрегация клеток в планктонной культуре обуславливает начальные этапы формирования биопленок, но не способствует приросту биомассы зрелых пленок, что наиболее очевидно в случае мутантов. Экстраклеточная ДНК является частью многокомпонентной системы, обеспечивающей сродство биопленок к поверхностям с разными физико-химическими свойствами и их структурную целостность.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, агрегация бактерий, матрикс биопленок, экстраклеточная ДНК.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406>



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





Введение

Альфапротеобактерии *Azospirillum brasilense* обитают в разнообразных природных средах, в частности в фитосфере, и могут вступать в ассоциативное взаимодействие с широким кругом растений [1]. Определенное значение для успешного функционирования растительно-микробной ассоциации может иметь способность азоспирилл формировать биопленки – сообщества бактерий, внедренных в толстый слизистый слой матрикса [2]. Информация о микроструктуре биопленок азоспирилл, в частности о морфологии клеток, интегрированных в биопленку, и основных компонентах матрикса (внеклеточные полисахариды, белки и ДНК) фрагментарна, но необходима для понимания механизмов формирования и дисперсии биопленок, подбора способов управления данными процессами. Так, дефекты в образовании полярного жгутика (Fla), липополисахаридов (ЛПС) и полисахаридов, связывающих калькофлуор, оказывают заметное влияние на эффективность формирования биопленок соответствующих мутантов штамма *A. brasilense* Sp245 [3–5]. Сохранение Fla на клетках *A. brasilense* Sp245, интегрированных в зрелую биопленку, способствует поддержанию ее целостности и повышает ее устойчивость в условиях гидродинамического сдвига [4]. Отличные от жгутиков белковые компоненты поверхности азоспирилл, чувствительные к действию проназы и трипсина, необходимы для прочного соединения бактерий в биопленках и вносят вклад в прикрепление биопленок к субстрату [6].

Биопленки многих микроорганизмов также содержат в составе матрикса экстраклеточную ДНК (эДНК) [7]. Считается, что эДНК – это компонент матрикса, освобождающийся в связи с лизисом клеток, однако для некоторых бактерий показано участие эДНК в процессе агрегации клеток [8]. Например, это справедливо для бактерий рода *Rhodovulum*, способных к самоосаждению [9]. Внеклеточные ДНК являются компонентами матрикса биопленок *A. brasilense* [10]. Участие этих компонентов в организации архитектуры пленок азоспирилл остается неясным. В планктонной культуре флокуляция бактерий, опосредованная компонентами клеточной поверхности, характерна для азоспирилл [5, 11, 12], однако взаимосвязь процессов агрегации клеток и формирования биопленок у этих микробов не исследована.

Поскольку формирование и устойчивость микроструктуры биомассы биопленок азоспирилл обусловлены в том числе и компонентами их клеточной поверхности, мутанты, лишенные

жгутиков, являются удобной моделью для изучения функциональной роли компонентов матрикса бактериальных биопленок. В данном аспекте интересны мутант Sp245 по гену *flhB1* (кодирует компонент экспортной жгутиковой поры) и мутанты Sp245 по предполагаемым генам 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназы (*mmsB1*) и 3-оксоацил-[ацил-переносающий белок]-редуктазы (*fabG1*). Эти мутанты имеют дефекты в образовании латеральных жгутиков (Laf) и/или Fla и соответственно в роении и активном плавании [13, 14]. Инактивация предполагаемых генов *fabG1* или *mmsB1* также повлияла на такие характеристики бактерий, как относительное содержание ряда жирных кислот в препаратах ЛПС и гидрофобность планктонных клеток [5].

Целью данной работы явилось исследование значения агрегации клеток и эДНК для стабилизации биопленок азоспирилл.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали штамм *A. brasilense* Sp245, выделенный из корней пшеницы [15], и его инсерционные Km^R Fla⁻ Laf⁻ Sp245.1063 (*flhB1::Omegon-Km*) [13], leaky Fla⁻ Laf⁻ Sp245.1610 (*fabG1::Omegon-Km*) и leaky Fla⁻ SK039 (*mmsB1::Omegon-Km*) мутанты [14].

Среды для культивирования бактерий. Культивирование бактерий проводили на минимальной малатно-солевой среде (MSM) [16] или богатой среде LB [17] при 28°C. При выращивании устойчивых к канамицину мутантов в среды вносили канамицин (Km) до 50 мкг/мл.

Оценка биомассы биопленок. Жидкие 18-часовые бактериальные культуры разбавляли средой LB или MSM до A_{590} , равной 0.05–0.10, вносили в стеклянные пробирки (по 2 мл) и инкубировали при 28°C стационарно. Перед окрашиванием биопленок удаляли планктонные бактерии. Биопленки окрашивали 1%-ным водным раствором красителя кристаллического фиолетового при комнатной температуре 10 мин и дважды промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в этаноле и измеряли A_{590} [4]. Пленки, сформированные на покровных стеклах, использовали для микроскопии.

Исследование агрегации бактериальных клеток. По 5 мл бактериальных культур, выращенных в условиях интенсивной аэрации, или жидких культур планктонных бактерий, окружавших биопленки, отстаивали в течение 30 мин [11, 12]. Осторожно декантировали жидкость, а из осевших агрегатов готовили взвесь в 5 мл 50 мМ фосфатного буфера (ФБ; pH 7.0) и оставляли для



отстаивания на 2 ч. Измеряли A_{590} надосадочной жидкости, затем осевшие агрегаты клеток 2 мин диспергировали в жидкости с помощью магнитной мешалки. Процент агрегационной дисперсии определяли по формуле

$$A = ((A_{590})_2 - (A_{590})_1) / (A_{590})_1 \times 100 \%,$$

где $(A_{590})_1$ – показатель A_{590} культуральной жидкости (взвеси) после отстаивания агрегатов до их диспергирования, а $(A_{590})_2$ – показатель A_{590} взвеси после диспергирования агрегатов.

Обработка биоленок ДНКазой. ДНКазу (Fluka, Швейцария) растворяли в 10 мМ Tris-HCl буфере (рН 8.0), содержащем 2 мМ CaCl₂, до концентрации 1 мг/мл. В контрольных вариантах использовали ФБ (рН 7.0). По 2 мл раствора фермента, разведенного в 50 мМ ФБ (рН 7.0) в соотношении 1:9, добавляли к биоленкам, предварительно удалив планктонную культуру, и инкубировали 2 ч при 37°C. После инкубации биоленки однократно отмывали дистиллированной водой и окрашивали, как описано выше. Результаты выражали в процентах относительно соответствующих контрольных проб.

Оценка содержания нуклеиновых кислот в матриксе биоленок. Выделение компонентов матрикса и определение содержания в них нуклеиновых кислот проводили согласно рекомендациям, приведенным в работе [18]. Биомассу 6-суточных биоленок, сформированных на поверхности стекла, после удаления планктонных бактерий промывали 50 мМ ФБ (рН 7.0) и смывали пипетированием этим буфером. Анализировали легко смываемые компоненты, перешедшие в надосадочную жидкость при центрифугировании биомассы после ее промывания ФБ (рН 7.0) (ФБ-«экстракты»). Процедуру повторяли трижды, собирая надосадочную жидкость. Содержание в экстрактах белка, углеводсодержащих компонентов и нуклеиновых кислот определяли соответственно рекомендациям, описанным в работе [18].

Световая микроскопия биоленок. Фазово-контрастную микроскопию проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» при ИБФРМ РАН (Саратов) на аппарате Leica LMD 7000 (Leica, Германия).

Статистическая обработка результатов. Оценку биомассы биоленок выполняли 30–50 раз в каждом варианте опыта. В остальных случаях проводили не менее трех независимых экспериментов с количественными измерениями как минимум в трех повторностях. Результаты статистически обрабатывали с использованием пакета Micro-

soft Office Excel 2007. Доверительные интервалы определяли для 95%-ного уровня значимости.

Результаты и их обсуждение

Исследование динамики формирования биоленок. Было осуществлено сравнение динамики накопления биомассы в пленках, формируемых штаммом *A. brasilense* Sp245 и его дефектными по жгутикованию мутантами Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 на границе раздела фаз «жидкость – твердая гидрофильная поверхность (стекло)». В первые сутки инкубации бактерий в жидкой среде LB на поверхности стеклянных пробирок формировались тонкие пленки, при микроскопии которых просматривались разрозненные клеточные агрегаты (микроколонии). На 2–3-и сутки инкубации в жидкой среде LB биомасса штаммов Sp245, Sp245.1063 и Sp245.1610, закрепившихся на поверхности пробирок, стабилизируется – без существенных межштаммовых различий (рис. 1).

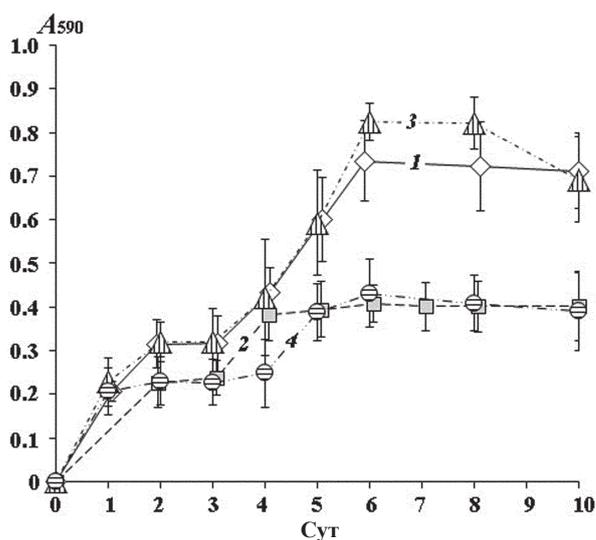


Рис. 1. Динамика накопления биомассы в биоленках, сформированных бактериями *A. brasilense* Sp245 (1), Sp245.1063 (2), Sp245.1610 (3) и SK039 (4) на поверхности стекла под жидкой средой LB в стационарных условиях. A_{590} – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биоленок

Вероятно, в данном временном промежутке завершается процесс адгезии бактерий на поверхности стекла. Лишь в случае бактерий штамма SK039 увеличивается продолжительность их адгезии на гидрофильной поверхности до 4 суток, что можно объяснить более высокой гидрофобностью клеток этого мутанта по сравнению с родительским штаммом Sp245 [5]. После завершения этого этапа бактериальные микроколонии сливаются в пленку с более ровной поверхностью, и начинается прирост биомассы. В случае штаммов Sp245.1063 и SK039



количество биомассы в биопленке стабилизируется к 4–5-м суткам инкубации и остается неизменным на всем протяжении культивирования (см. рис. 1). Толщина биопленок, сформированных родительским штаммом Sp245 или мутантом Sp245.1610, становится постоянной позже – после 6 дней инкубации (см. рис. 1). Таким образом, к 6-м суткам культивирования все исследованные штаммы формируют зрелую биопленку (см. рис. 1). На стекле под LB биомасса зрелых биопленок Sp245.1610

не отличается от показателей штамма Sp245, остальные мутанты образуют более тонкие пленки (см. рис. 1). Под MSM по сравнению с Sp245 все мутанты формируют биопленки с меньшим количеством биомассы (рис. 2, а). Результаты определения относительного количества биомассы в зрелых биопленках азоспирилл с помощью окрашивания и результаты прямых микроскопических измерений толщины биопленок согласуются между собой [4].

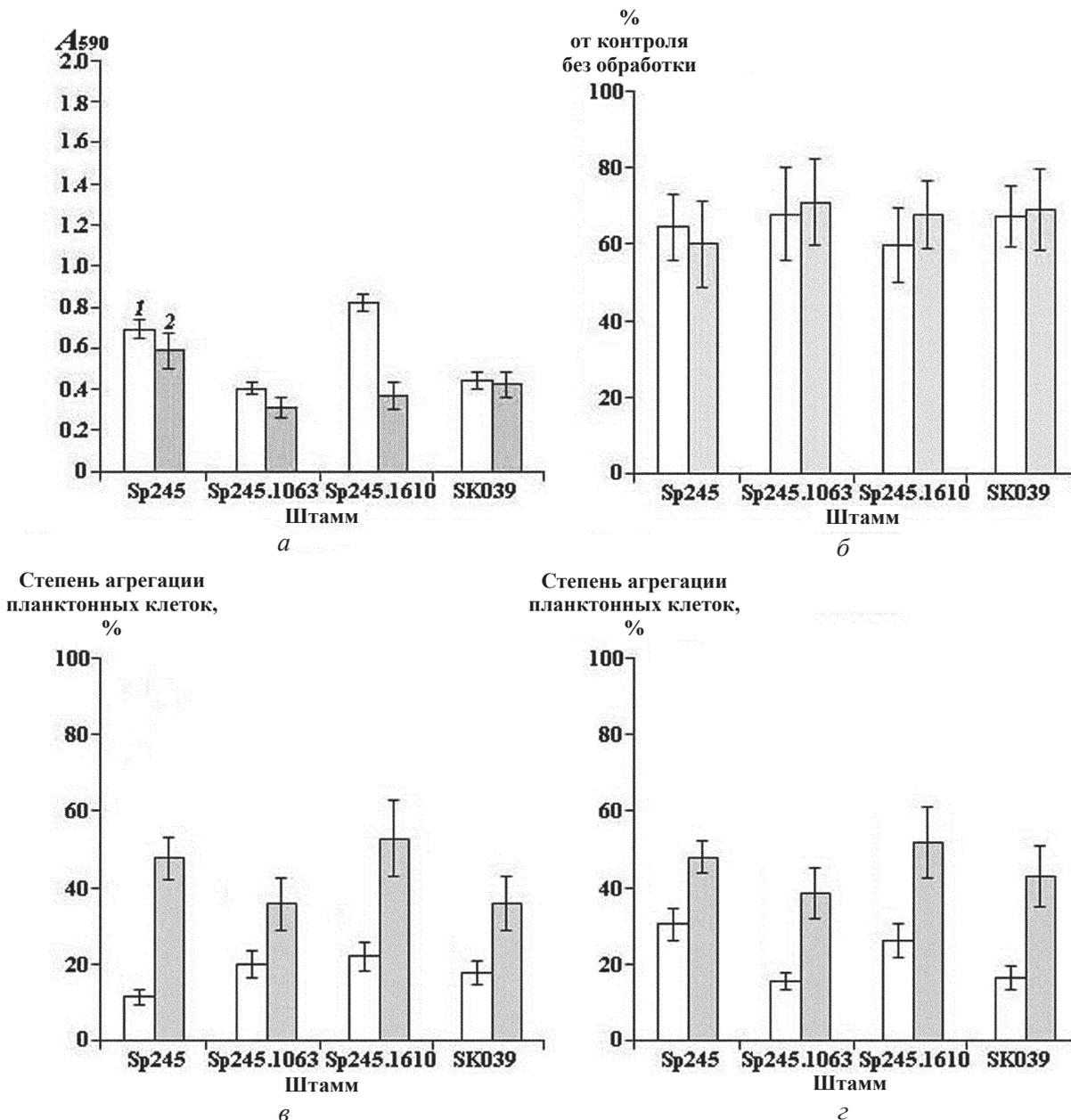


Рис. 2. Влияние ДНКазы (б) на биомассу биопленок *A. brasilense* (а), сформированных на стекле под жидкой средой LB (1) или MSM (2), и степень агрегации планктонных клеток (в, г) после 2 (в) и 6 (г) суток культивирования; а – A_{590} – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок *A. brasilense*; б – процентное отношение A_{590} красителя, десорбированного с окрашенных пленок после их инкубации в растворе ДНКазы (100 мкг/мл) к аналогичному показателю без обработки



Таким образом, начальные этапы формирования биопленки – прикрепление и адгезия бактерий на поверхности стекла, вероятно, протекают независимо от способности клеток синтезировать жгутики. Лишь в случае мутанта SK039 увеличивается продолжительность адгезии клеток на стекле до 4 суток. Тем не менее полноценный Fla необходим азоспириллам для активной адгезии [19]. Как уже отмечалось, на ранних этапах биопленки мутантов и родительского штамма образованы разрозненными клеточными агрегатами (микроколониями). Возможно, активная агрегация бактерий уже в планктонной культуре способствует их прикреплению к твердой поверхности, особенно в случае мутантов без полноценного Fla.

Влияние продолжительности и условий культивирования на способность бактерий к агрегации

Все штаммы имеют примерно одинаковую скорость роста на жидких средах LB или MSM. В статичных условиях в начале стационарной фазы роста на 2-е сутки культивирования (этап прикрепления бактерий к твердой поверхности (см. рис. 1)) в LB степень агрегации клеток в планктонных культурах Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 выше, чем у Sp245, при этом относительное количество биомассы в биопленках всех штаммов примерно одинаково (см. рис. 1, 2, в). Вероятно, активная агрегация бактерий уже в планктонной культуре способствует их прикреплению к твердой поверхности, особенно в случае мутантов без полноценного Fla, необходимого азоспириллам для активной адгезии [19].

При культивировании в LB на 6-е сутки в случае мутантов агрегация планктонных клеток не изменяется, а у Sp245 возрастает в 2 раза до уровня Sp245.1610 (см. рис. 2, з). На стекле относительное количество биомассы в биопленках этих штаммов в данный период культивирования также примерно одинаково (см. рис. 1, 2, а).

При культивировании в MSM стационарно клетки всех исследованных штаммов агрегировали примерно одинаково независимо от времени инкубации, а процент агрегации превышал данный показатель в LB (см. рис. 2, в, з). Тем не менее в MSM, как и в LB, сохраняются различия в толщине зрелых пленок Sp245 и Sp245.1063 или SK039 (см. рис. 2, а). Очевидно, что агрегация клеток в 6-суточной планктонной культуре этих трех штаммов существенным образом не влияет на количество биомассы зрелых биопленок. В случае Sp245.1610 под MSM толщина зрелых биопленок уступает показателю этого мутанта под LB (см. рис. 2, а). Одной из причин зависи-

мости толщины биопленок Sp245.1610 от состава среды культивирования могут являться различия в степени гидрофобности клеток этого мутанта, выросших в LB или MSM [5].

В условиях перемешивания (условия, позволяющие повысить содержание кислорода в среде культивирования) агрегация клеток неподвижных мутантов по сравнению с Sp245 выражена в меньшей степени. Так, к 18 ч культивирования на среде MSM для штаммов Sp245, Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 показатель агрегации клеток составляет соответственно (36.8 ± 7.9) , (21.8 ± 5.7) , (5.8 ± 0.6) и $(8.2 \pm 1.4)\%$. Агрегация 2-суточных культур в условиях перемешивания не изменяется. Например, к 48 ч культивирования на среде MSM у штаммов Sp245 и Sp245.1063 показатель агрегации клеток составляет соответственно (35.9 ± 6.2) и $(26.2 \pm 4.9)\%$. Стоит отметить, что к 48 ч на LB в условиях перемешивания агрегация клеток штамма Sp245 достигает максимальной величины $((69.2 \pm 1.9)\%)$, а у мутанта Sp245.1063 – минимальной $((4.7 \pm 1.6)\%)$ ниже.

Вполне вероятно, что подвижность и жгутики способствуют агрегации азоспирилл в зависимости от состава среды и содержания кислорода в среде культивирования (от степени насыщения среды кислородом). Так, даже в статичных условиях при фазово-контрастной микроскопии 18-часовых жидких культур Sp245 видно, что подвижные клетки этого штамма, сосредоточившиеся в результате аэротаксиса недалеко от границы раздела жидкость/воздух, образуют небольшие агрегаты (рис. 3). Клетки мутантов, лишенные полярной флагеллы, не обладают способностью к подобной быстрой агрегации.

Таким образом, способность бактерий к агрегации в планктонной культуре обуславливает начальные этапы формирования биопленок, но не способствует приросту биомассы зрелых пленок, что наиболее очевидно в случае мутантов с инактивированными генами *flhB*, *fabG1* или *mmsB1*. Результаты исследования позволили выявить у азоспирилл, различающихся по способности синтезировать жгутики, зависимость степени агрегации клеток в планктонной культуре и формирования ими биопленок от состава среды, продолжительности и условий культивирования, которые, в свою очередь, могут влиять на свойства компонентов клеточной поверхности микроорганизмов белковой и полисахаридной природы [5, 11, 12, 20]. Важным интегральным компонентом для процесса агрегации клеток некоторых микроорганизмов является эДНК. Например, обработка клеток бактерий рода *Rhodovulum* нуклеазами приводит к прекращению процесса их

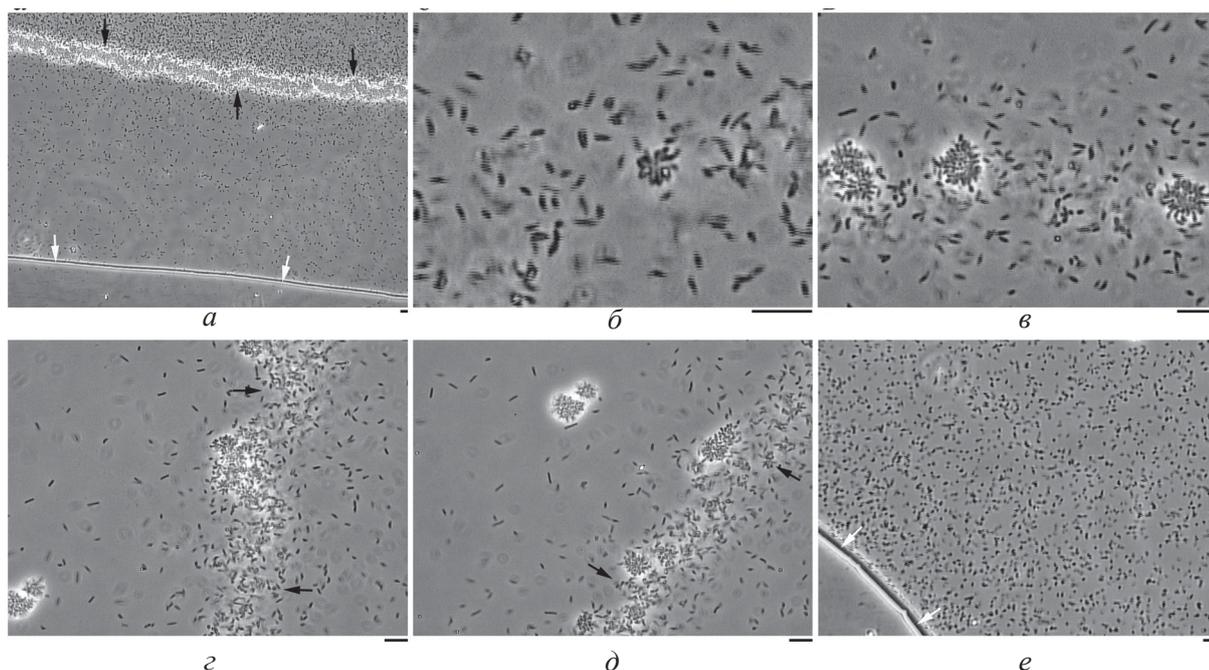


Рис. 3. Фазово-контрастная микроскопия 18-часовых жидких культур *A. brasilense* Sp245 (а–д) и Sp245.1063 (е), выращенных в LB, спустя 1 (б), 5 (в), 10 (г, д) и 15 мин (а, е) после приготовления препарата для микроскопии. Черными стрелками обозначена область максимального сосредоточения подвижных клеток недалеко от отмеченной белыми стрелками границы раздела жидкость/воздух. Масштабная линейка соответствует 10 мкм

самоосаждения [9]. Внеклеточные ДНК являются компонентами матрикса пленок *A. brasilense* [10], однако функция этих компонентов в биопленках азоспирилл остается неясной.

Исследование устойчивости биомассы биопленок к действию ДНКазы

Оценка содержания белковых, углеводсодержащих составляющих и нуклеиновых кислот в матриксе, полученном из смывы с поверхности стекла биомассы биопленок штамма Sp245, показала, что в ФБ-«экстрактах» перечисленные компоненты распределяются в следующем соотношении: 1.0/3.6/0.5 (матрикс из биопленок, сформированных под LB) или 1.0/4.1/0.1 (матрикс из биопленок, сформированных под MSM).

После инкубации с ДНКазой (100 мкг/мл) биомасса биопленок Sp245, сформированных под LB на стекле, убывала на 36% (см. рис. 2, б). Мутанты Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 теряли примерно такое же количество биомассы (32–40%). Аналогичная устойчивость к действию фермента выявлена и у биопленок, образованных под MSM (см. рис. 2, в). После обработки ДНКазой биомасса биопленок штамма Sp245 снижалась на 40%, а мутанты теряли примерно 29–33% биомассы (см. рис. 2, в).

По нашим неопубликованным данным, после инкубации с 40 мМ раствором периодата

натрия, окисляющего полисахариды, биомасса зрелых биопленок Sp245, сформированных на стекле под LB, убывает на 40%, а в случае лишенных жгутиков мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 эта величина составляет 60–75%. На стекле под MSM устойчивость биопленок всех штаммов к периодатному окислению возрастает, а биомасса биопленок снижается примерно на 20% (наши неопубликованные данные). После инкубации с проназой (100 мкг/мл) биомасса биопленок Sp245 или SK039, сформированных под LB на стекле, уменьшается на 20–30%, а в случае штамма Sp245.1610 на 46% [6]. Устойчивость образованных под MSM биопленок исследованных штаммов к действию протеазы была одинаковой. После обработки проназой биомасса биопленок уменьшалась примерно на 21–31% [6].

Таким образом, в исследованном нами матриксе биопленок бактерий вида *A. brasilense* содержание белковых и углеводсодержащих компонентов преобладает над содержанием нуклеиновых кислот, однако влияние инкубации с ДНКазой, снижающей биомассу биопленок всех исследованных штаммов, сопоставимо с воздействием на пленки азоспирилл протеазы и периодатного окислителя полисахаридов. Результаты этих сравнений позволяют полагать, что



эДНК является частью многокомпонентной системы, обеспечивающей как средство биопленок к поверхностям с разными физико-химическими свойствами, так и их структурную целостность.

Список литературы

1. *Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y.* Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2012. Vol. 326, № 2. P. 99–108.
2. *Bogino P. C., Oliva M. M., Sorroche F. G., Giordano W.* The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // Intern. J. Mol. Sci. 2013. Vol. 14. P. 15838–15859.
3. *Шелудько А. В., Кулибякина О. В., Широков А. А., Петрова Л. П., Матора Л. Ю., Кацы Е. И.* Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлур, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2008. Т. 77, № 3. С. 358–363.
4. *Шелудько А. В., Филиппчева Ю. А., Шумилова Е. М., Хлебцов Б. Н., Буров А. М., Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Изменения в формировании биопленок у *fhhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84, № 2. С. 175–183.
5. *Шумилова Е. М., Шелудько А. В., Филиппчева Ю. А., Евстигнеева С. С., Пономарева Е. Г., Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *tmsB1* и *fabG1* // Микробиология. 2016. Т. 85, № 2. С. 162–170.
6. *Телешева Е. М., Сиякин Д. Н., Шелудько А. В., Филиппчева Ю. А., Пономарева Е. Г., Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Анализ влияния протеаз на структуру биопленок штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и его дефектных по жгутикованию *tmsB1* и *fabG1* мутантов // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 322–327.
7. *Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P. H.* Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin // Water Res. 1996. Vol. 30. P. 1749–1758.
8. *Molin S., Tolker-Nielsen T.* Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. Vol. 14. P. 255–261.
9. *Watanabe M.* Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. Vol. 50. P. 682–691.
10. *Ramírez-Mata A., López-Lara L. I., Xiqui-Vázquez L., Jijón-Moreno S., Romero-Osorio A., Baca B. E.* The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* // Res. in Microbiol. 2016. Vol. 167. P. 190–201.
11. *Madi L., Henis Y.* Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd : conditions and factors involved in cell-to cell adhesion // Plant Soil. 1989. Vol. 115, № 1. P. 89–98.
12. *Никитина В. Е., Пономарева Е. Г., Аленкина С. А., Коннова С. А.* Участие бактериальных лектинов клеточной поверхности в агрегации азоспирилл // Микробиология. 2001. Т. 70, № 4. С. 471–476.
13. *Ковтунов Е. А., Петрова Л. П., Шелудько А. В., Кацы Е. И.* Инсерция транспозона в хромосомную копию гена *fhhB* сопровождается дефектами в образовании полярного и латеральных жгутиков у бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 // Генетика. 2013. Т. 49, № 8. С. 1013–1016.
14. *Ковтунов Е. А., Шелудько А. В., Чернышова М. П., Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Мутанты бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 со вставкой омегона в генах липидного метаболизма *tmsB* или *fabG* дефектны по подвижности и жгутикованию // Генетика. 2013. Т. 49, № 11. С. 1270–1275.
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. *Döbereiner J., Day J. M.* Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symposium on Nitrogen Fixation / eds. W. E. Newton, C. J. Nijmans. Pullman : Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
17. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* Molecular Cloning : a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
18. *Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L. Z.* Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // ISME J. 2017. Vol. 11. P. 1602–1613.
19. *Croes C. L., Moens S., Bastelaere E. van, Vanderleyden J., Michiels K. W.* The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots // J. Gen. Microbiol. 1993. Vol. 139, № 9. P. 2261–2269.
20. *Dufrene Y. E., Rouxhet P. C.* Surface composition, surface properties and adhesiveness of *Azospirillum brasilense* – variation during growth // Can. J. Microbiol. 1996. Vol. 42. P. 548–556.

On the Contribution of Cell Aggregation and Extracellular DNA to Biofilm Formation and Stabilization in *Azospirillum brasilense* Bacteria

Yu. A. Filip'echeva, E. M. Telesheva, S. S. Yevstigneyeva, A. V. Shelud'ko, E. G. Ponomareva, L. P. Petrova, E. I. Katsy

Yulia A. Filip'echeva, <https://orcid.org/0000-0003-3182-1007>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, ljuce@yandex.ru

Elizaveta M. Telesheva, <https://orcid.org/0000-0001-9405-1877>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, sentebrinka@mail.ru



Stella S. Yevstigneyeva, <https://orcid.org/0000-0001-6789-7324>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, stels20295@yandex.ru

Andrei V. Shelud'ko, <https://orcid.org/0000-0002-2535-5225>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, shel71@yandex.ru

Elena G. Ponomareva, <https://orcid.org/0000-0003-3701-9090>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, ponomareva_e@ibppm.ru

Lilia P. Petrova, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, petrova_lp@mail.ru

Elena I. Katsy, <https://orcid.org/0000-0002-3299-3372>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, ei_katsy@mail.ru

Little is known about the functions of the principal matrix components and about the role of cell surface structures in the formation and stabilization of *Azospirillum* biofilms. It is known that as compared with *A. brasilense* strain Sp245, its *flhB1*, *fabG1*, and *mmsB1* mutants, defective in flagellar assembly, form biofilms less well. We made comparative study of bacterial aggregation, biofilm formation, and the effect of DNAase on biofilms. The results show that in planktonic culture, cell aggregation determines the initial stages in biofilm formation but does not contribute to biomass growth in mature films (observed most clearly with the mutants). Extracellular DNA is part of a multicomponent system that ensures the affinity of biofilms to physicochemically different surfaces and the structural integrity of biofilms.

Key words: *Azospirillum brasilense*, bacterial aggregation, biofilm matrix, extracellular DNA.

Образец для цитирования:

Филипъчева Ю. А., Телешева Е. М., Евстигнеева С. С., Шелудько А. В., Пономарева Е. Г., Петрова Л. П., Кацы Е. И. О вкладе агрегации клеток и экстраклеточной ДНК в формирование и стабилизацию биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 399–406. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406>

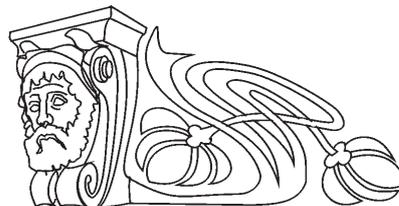
Cite this article as:

Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Yevstigneyeva S. S., Shelud'ko A. V., Ponomareva E. G., Petrova L. P., Katsy E. I. On the Contribution of Cell Aggregation and Extracellular DNA to Biofilm Formation and Stabilization in *Azospirillum brasilense* Bacteria. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 399–406 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406>



УДК 612.171.1

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИСТЕМНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ РОССИЙСКИХ И ИНОСТРАННЫХ СТУДЕНТОВ НА ФОНЕ ОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОБЫ



Г. А. Севрюкова, Г. Э. Настинова, Л. А. Товмасын, П. Л. Севрюкова

Севрюкова Галина Александровна, доктор биологических наук, профессор кафедры промышленной экологии и безопасности жизнедеятельности, профессор кафедры биологии, Волгоградский государственный технический университет, sevrykova2012@yandex.ru

Настинова Галина Эрднеевна, доктор географических наук, профессор кафедры общей биологии и физиологии, Калмыцкий государственный университет, Элиста, nastinova.ge@yandex.ru

Товмасын Лаура Андреевна, лаборант-исследователь кафедры биологии, Волгоградский государственный университет, laura7709@yandex.ru

Севрюкова Полина Леонидовна, магистрант, Волгоградский государственный социально-педагогический университет, p.sevrykova2017@yandex.ru

Настоящая работа посвящена сравнительному анализу функционального состояния системной гемодинамики у российских и иностранных студентов в зависимости от локализации переходной зоны в грудных отведениях ЭКГ в процессе выполнения активной ортостатической пробы. Оценивалось физическое развитие, измерялись параметры артериального давления, регистрировалась ЭКГ с помощью модуля «Электрокардиограмма» АПК «Валента». Преобладание астенического типа телосложения у иностранных студентов на фоне недостаточности физического развития обуславливает вертикальную топографию расположения сердца. Однотипные реакции сердечно-сосудистой системы у российских и иностранных студентов на фоне гравитационных изменений свидетельствуют о влиянии локальной электрофизиологической позиции сердца, особенно в группах V_{1-2} и с неопределенной локализацией переходной зоны в грудных отведениях ЭКГ, на процессы вегетативной регуляции сердечной деятельности.

Ключевые слова: адаптация, иностранные студенты, физическое развитие, ЭКГ, артериальное давление, переходная зона в грудных отведениях, физиология человека.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-407-411>

Введение

Обучение иностранных студентов на коммерческой основе в вузах России – в настоящее время не только реальность, но и экономическая потребность. Успешная адаптация иностранных студентов в различных ее проявлениях (климатические условия региона, иная языковая среда, социокультурные проблемы, психофизиологические аспекты) предопределяет эффективность

освоения ими образовательной программы в вузе. В рамках многокомпонентной адаптации иностранных студентов к условиям проживания и обучения в вузах Волгоградского региона с учетом его континентальных особенностей климата (переохлажденного зимой и перегретого летом) важным является сохранение необходимого уровня функционирования организма за счет мобилизации функциональных резервов, что, в свою очередь, приводит к напряжению регуляторных систем [1]. В этом аспекте актуальным является исследование деятельности сердечно-сосудистой системы как системы, первой реагирующей на привнесенные изменения в деятельность организма в целом.

Целью исследования явилась сравнительная оценка функционального состояния системной гемодинамики российских и иностранных студентов на фоне ортостатической пробы.

Материалы и методы

Исследование проводилось с участием иностранных студентов, приезжающих на обучение в вузы г. Волгограда из Ирака, Шри-Ланки, Ганы, Сомали, Гвинеи, Палестины, Сирии (58 чел.; $21,2 \pm 0,9$ лет) и российских студентов (72 чел.; $20,1 \pm 0,6$ лет) на добровольной основе. Все обследуемые – лица мужского пола. Соблюдение принципа информированного согласия достигалось информированием об условиях проведения исследования и используемых методиках, сообщением о гарантиях неразглашения полученной информации.

Исследование включало оценку физического развития и антропометрических данных с использованием общепринятых показателей (В. В. Бунак, 1941), регистрацию ЭКГ (модуль «Электрокардиография» АПК «ВАЛЕНТА» РУ № ФСР 2007/00259 от 26.03.2009, г. Санкт-Петербург), параметров системной гемодинамики в условиях оперативного покоя и на фоне ортостатической пробы.

Статистический анализ первичных данных проведен с помощью программного пакета «Excel-2010».



Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования оценивалось физическое развитие иностранных и отечественных студентов, параметры которого отражают состояние метаболических процессов в организме (табл. 1).

Оценка тотальных величин (рост, вес) и на их основе расчет интегральных показателей (индекс массы тела (ИМТ), индекс Эрисмана (ИЭ), индекс Пинье (ИП)), характеризующих гармоничность физического развития обследуемых, позволила установить отсутствие достоверных межгрупповых различий, что свидетельствует о равнозначности подобранных групп сравнения. Однако в группах сравнения отмечаемое отклонение от возрастной нормы по индексу Эрисмана, характеризующему пропорциональность развития грудной клетки, свидетельствует о недостаточности физического развития, особенно в группе иностранных студентов ($1,2 \pm 3,6$ у.е.). При этом отклонение в сторону дефицита массы тела (ИП: $25,4 \pm 7,04$, у.е.) также отмечается в группе иностранных студентов. Следует отметить, что степень разброса данных (дисперсия) по индексам Эрисмана и Пинье в группах сравнения свидетельствует о внутригрупповой неоднородности.

Таблица 1

Антропометрические данные в группах российских и иностранных студентов
($M \pm m$; $n_{\text{рос}} = 72$; $n_{\text{инстр}} = 58$)

Параметр	Группы студентов	$M \pm m$
Возраст	Российские	$20,1 \pm 0,6$
	Иностранные	$21,2 \pm 0,9$
Рост, см	Российские	$181,2 \pm 2,9$
	Иностранные	$179,8 \pm 2,46$
Вес, кг	Российские	$72,6 \pm 3,96$
	Иностранные	$66,4 \pm 4,73$
ИМТ, у.е.	Российские	$22,4 \pm 1,19$
	Иностранные	$20,1 \pm 1,27$
ИЭ, у.е.	Российские	$2,91 \pm 3,01$
	Иностранные	$1,2 \pm 3,6$
ИП, у.е.	Российские	$14,3 \pm 6,5$
	Иностранные	$25,4 \pm 7,04$

На следующем этапе исследования все обследуемые были распределены на группы в зависимости от локализации переходной зоны в грудных отведениях ЭКГ: смещение переходной зоны в V_{1-2} (I группа); локализация переходной зоны в V_3 (II группа); смещение переходной зоны

в V_{4-5} (III группа) и локализация переходной зоны неопределенна (IV группа) [2]. При этом процентное соотношение $V_{1-2} : V_3 : V_{4-5} : V_{\text{неопр}}$ в группах сравнения оказалось следующим: российские студенты 19:36:25:20; иностранные студенты 8:16:53:23, т.е. по количеству респондентов в группе иностранных студентов преобладали лица с локализацией переходной зоны в V_{4-5} . Внутригрупповое выделение и сравнение соматотипов антропометрическим методом позволило установить преобладание астенического типа телосложения в 52,5% случаев в группе иностранных студентов. Они действительно имели высокий рост (в среднем по группе $179,8 \pm 2,46$ см) и худощавое телосложение ($66,4 \pm 4,73$ кг) и, как следствие, у них отмечалась по данным ЭКГ вертикализация проекции вектора электрической оси сердца.

Рассматривая особенности системной гемодинамики в условиях оперативного покоя, следует отметить, что значения частоты сердечных сокращений (ЧСС) в группах иностранных студентов по сравнению с российскими студентами были выше независимо от локализации переходной зоны в грудных отведениях (табл. 2). Однако при межгрупповом сравнении наибольшая ЧСС отмечалась в группах сравнения с неопределенной локализацией переходной зоны, и у иностранных студентов она достоверно отличалась от российских ($p < 0,05$).

Повышенное систолическое артериальное давление (АДс) в среднем по группам иностранных студентов V_{4-5} ; $V_{\text{неопр}}$ ($136,2 \pm 4,43$; $148,6 \pm 10,3$ мм рт. ст. соответственно) по сравнению с таковым в остальных группах, и особенно по сравнению с российскими студентами, свидетельствует о работе миокарда в режиме напряжения. Об этом также свидетельствует коэффициент выносливости сердечно-сосудистой системы ($KB_{\text{СС}}$), который был снижен по сравнению с возрастной нормой в группах V_{4-5} и $V_{\text{неопр}}$.

Диастолическое артериальное давление (АДд) также оказалось повышенным в группе иностранных студентов с неопределенной локализацией переходной зоны на $17,3$ мм рт. ст. по сравнению с таковым у российских студентов ($p < 0,05$). Пульсовое артериальное давление АДп в сравниваемых группах не имело достоверных различий.

Показатель, характеризующий выносливость и возможности сердечно-сосудистой системы при сравнении с нормативными данными указывает на преобладание симпатической направленности нейровегетативного тонуса, напряжение регуляторных механизмов, снижение выносливости и ухудшение функциональных возможностей



Таблица 2

**Параметры системной гемодинамики в группах российских и иностранных студентов
в условиях оперативного покоя ($M \pm m$; $n_{\text{рос}} = 72$; $n_{\text{инностр}} = 58$)**

Параметр	Группы студентов	I группа – V_{1-2}	II группа – V_3	III группа – V_{4-5}	IV группа неопр.
ЧСС	Российские	63,2±3,22	71,8±1,68	64,5±5,31	74,8±3,42
	Иностранные	78,1±4,01	74,3±4,18	79,8±3,44	83,0±3,2*
АДс	Российские	114,7±2,13	116,3±2,56	122,1±3,09	110,14±3,47
	Иностранные	121,3±3,6	124,5±6,5	136,2±4,43	148,6±10,3
АДд	Российские	69,7±2,83	73,2±1,76	66,2±1,65	65,0±1,73
	Иностранные	77,2±3,4	63,5±2,5	71,4±1,6	82,3±3,33*
АДп	Российские	45,0±1,95	45,9±1,68	55,0±5,78	46,7±4,11
	Иностранные	44,8±4,3	61,0±2,9	64,8±5,37	66,3±4,8
КВ _{сcc}	Российские	14,0±0,54	15,2±0,79	12,2±1,3**	11,5±0,48**
	Иностранные	17,7±1,2	12,03±0,68**	12,6±0,63**	13,1±2,7**

Примечание. * – достоверное различие показателей при межгрупповом сравнении (российские и иностранные студенты); ** – различие по сравнению с условной нормой.

сердечно-сосудистой системы у российских и иностранных студентов. Отклонение коэффициента выносливости сердечно-сосудистой системы у российских и иностранных студентов с локализацией переходной зоны в V_{4-5} от нормы составляет 23,7 и 21,2% соответственно; в группах с неопределенной локализацией – 28,1 и 18,1% соответственно; в группе иностранных студентов с локализацией переходной зоны в V_3 – 24,8%.

Для оценки способности сердечно-сосудистой системы противодействовать возмущающему влиянию нагрузки (ортопроба) в работе использовался количественный критерий – коэффициент сдвига на нагрузку (КС), позволяющий судить о приспособительных реакциях организма (рисунок).

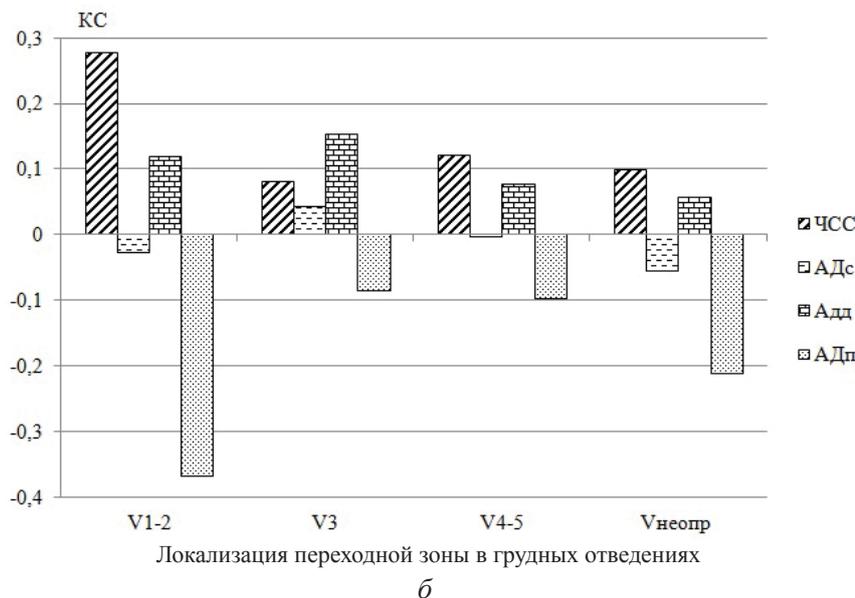
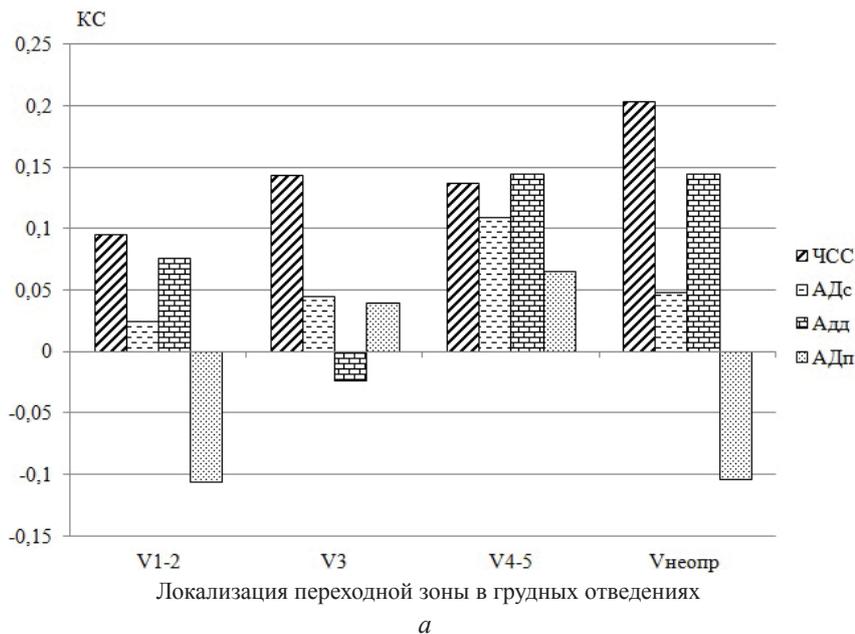
Наиболее адекватная реакция сердечно-сосудистой системы на фоне активной ортопробы отмечалась у российских студентов с локализацией переходной зоны в V_3 . Наши данные согласуются с данными литературы, свидетельствующими о том, что сдвиги пульса (в нашем случае учащение ЧСС на 11,1 уд/мин) и систолического АД (повышение на 8,3 мм рт. ст.) носят пропорциональный характер и свидетельствуют о хорошей приспособляемости сердечно-сосудистой системы к гравитационным нагрузкам. При этом отмечалось снижение диастолического АД в среднем по группе на 4,8 мм рт. ст., что обуславливало повышение пульсового АД [2]. Срочная реакция сердечно-сосудистой системы на фоне активной ортостатической пробы у российских студентов группы V_3 характеризовалась учащением ЧСС

(КС = 0,143 у.е.), повышением систолического АД (КС = 0,044 у.е.), незначительным понижением диастолического АД (КС = -0,023 у.е.) и соответственно увеличением пульсового давления (КС = 0,039 у.е.). Повышение пульсового давления, косвенно характеризующего увеличение ударного объема сердца, подъем систолического, отражающего усиление систолы левого желудочка, и снижение диастолического АД (уменьшение тонуса артериол) обеспечивали лучший доступ крови к периферии [3, 4].

Наиболее неблагоприятные реакции со стороны сердечно-сосудистой системы регистрировались у российских студентов в группах с локализацией переходной зоны в V_{1-2} и $V_{\text{неопр}}$, а также во всех группах иностранных студентов. Примечательным оказалось снижение пульсового давления (коэффициент сдвига на нагрузку имел отрицательную направленность).

В группах российских студентов (V_{1-2} ; $V_{\text{неопр}}$) отмечалось учащение пульса, повышение систолического АД с одновременным значительным повышением диастолического АД. Повышение систолического АД указывает на развитие неадекватной реакции, т.е. о нарушении вегетативного обеспечения в деятельности сердечно-сосудистой системы.

В группах иностранных студентов на фоне исходно повышенного систолического АД отмечались разнонаправленные изменения этого показателя в ответ на гравитационную нагрузку (в группах V_{1-2} ; $V_{\text{неопр}}$ – незначительное снижение; в группе V_3 – незначительное повышение)



Коэффициент сдвига реакций сердечно-сосудистой системы на фоне активной ортостатической пробы в группах студентов: *а* – российских; *б* – иностранных

в сочетании с повышением диастолического давления, что, в свою очередь, приводило к резкому снижению пульсового давления, особенно в группах с локализацией переходной зоны в V_{1-2} и $V_{неопр}$, и указывало на напряжение регуляторных систем и нестабильность процессов деятельности сердечно-сосудистой системы.

Заключение

Функциональное состояние системной гемодинамики во многом предопределено деятельностью сердечно-сосудистой системы и отражает адаптивные возможности организма в

измененных условиях жизнедеятельности. Выявленные неблагоприятные реакции со стороны сердечно-сосудистой системы у иностранных студентов независимо от локализации переходной зоны в грудных отведениях свидетельствуют о нестабильности процессов адаптации и напряжении регуляторных систем.

Отмечаемые схожие реакции сердечно-сосудистой системы на фоне гравитационных изменений как у российских, так и у иностранных студентов, отнесенных к группам V_{1-2} и с неопределенной локализацией переходной зоны в грудных отведениях ЭКГ, свидетельствуют о взаимообусловлен-



ности процессов вегетативной регуляции и топографии электрофизиологической позиции сердца.

Особый интерес представляют данные о структурно-функциональных изменениях сердечно-сосудистой системы у иностранных студентов. Вертикализация проекции вектора электрической оси сердца, отмечаемая в 52,5% случаев, коррелирует с показателями соматического статуса у этих студентов, обусловленного процессами астенизации (дефицит массы тела при достаточно высоком росте). Усиление метаболических процессов в организме иностранных студентов, возможно, обусловлено тем, что заезд данного контингента обследуемых пришелся на холодный период года (декабрь 2017 – январь 2018 гг.). Адаптируясь, организм вынужден функционально перестраиваться адекватно конкретным условиям, в нашем случае имело место резкое изменение климатических условий проживания (тропический и субтропический климат сменился холодным малоснежным периодом континентального климата Волгоградского региона).

Все вышеизложенное позволяет заключить о возможных осложнениях в процессах адаптации и акклиматизации иностранных студентов, что непосредственно может сказаться на состоянии общего здоровья и отразиться на эффективности образовательной деятельности.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-013-00795).

Список литературы

1. Севрюкова Г. А., Картушина Ю. Н., Бочарова И. А. Эколого-физиологические аспекты адаптации иностранных студентов, прибывших для обучения в Россию (на примере Волгоградского региона) // Вестн. Волгогр. гос. ун-та. Сер. 11: Естественные науки. 2015. № 4 (14). С. 15–21. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=25460710>
2. Севрюкова Г. А., Исупов И. Б., Товмасян Л. А. К вопросу о взаимном соответствии переходной зоны в грудных отведениях ЭКГ, сердечного ритма и церебральной гемодинамики // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия.

Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 337–344. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2017-17-3-337-344>

3. Епифанов В. А. Лечебная физкультура при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Лечебная физкультура и спортивная медицина. 2010. № 12. С. 59–66.
4. Мотылянская Р. Е., Ерусалимский Л. А. Врачебный контроль при массовой физкультурно-оздоровительной работе. М. : Физкультура и спорт, 1980. 96 с.

The Functional State of Systemic Hemodynamics Russian and Foreign Students at Orthostasis

G. A. Sevriukova, G. E. Nastinova,
L. A. Tovmasian, P. L. Sevriukova

Galina A. Sevriukova, <https://orcid.org/0000-0002-7933-3523>, Volgograd State Technical University, 28, Lenin Ave.; Volgograd State Technical University, 100, Prospekt Universitetsky, Volgograd, 400062, Russia, sevrykova2012@yandex.ru

Galina E. Nastinova, Kalmyk State University, 11, Pushkina Str., Elista, 358000, Russia, nastinova.ge@yandex.ru

Layra A. Tovmasian, <https://orcid.org/0000-0002-3571-9694>, Volgograd State University, 100, Universitetsky Ave., Volgograd, 400062, Russia, laura7709@yandex.ru

Polina L. Sevriukova, Volgograd State Social and Pedagogical University, 27, Lenin Ave., Volgograd, 400066, Russia, p.sevrykova2017@yandex.ru

This work is devoted to the comparative analysis of the functional state of systemic hemodynamics in Russian and foreign students depending on the localization of the transition zone in the chest leads of ECG during the active orthostatic test. Having assessed physical development, we measured the parameters of arterial pressure and ECG using the module «Electrocardiogram» APK «Valenta». The prevalence of asthenic type of physique in foreign students against the deficiency of physical development determines the vertical position of the heart. Similar reactions of the cardiovascular system in Russian and foreign students at orthostasis indicate the influence of the local electrophysiological position of the heart, especially in groups V₁₋₂ and with indefinite localization of the transition zone in the chest leads of ECG, on the processes of vegetative regulation of cardiac activity.

Key words: adaptation, foreign students, physical development, ECG, blood pressure, a transition zone in the chest leads, human physiology.

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Researches (project no. 18-013-00795).

Образец для цитирования:

Севрюкова Г. А., Настинова Г. Э., Товмасян Л. А., Севрюкова П. Л. Функциональное состояние системной гемодинамики российских и иностранных студентов на фоне ортостатической пробы // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 407–411. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-407-411>

Cite this article as:

Sevriukova G. A., Nastinova G. E., Tovmasian L. A., Sevriukova P. L. The Functional State of Systemic Hemodynamics Russian and Foreign Students at Orthostasis. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 407–411 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-407-411>



УДК 581.144

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА *TRITICUM DURUM* L.

В. В. Коробко, О. Ф. Шевлягина

Коробко Валерия Валерьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, v.v.korobko@mail.ru

Шевлягина Олеся Федоровна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, oshevyagina@mail.ru

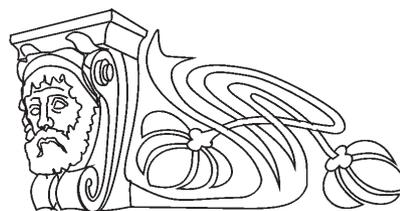
Объектом исследования служили проростки яровой твердой пшеницы *Triticum durum* L. Культивирование осуществлялось при температуре $15\pm 1^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$. Для изучения влияния температурного фактора (в пределах оптимальных для пшеницы значений) на развитие фотосинтетического аппарата проростков определяли количественное содержание хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов. Выделены сорта, которые на изменение температуры культивирования реагируют изменением показателей, характеризующих стрессоустойчивость растений, а именно соотношением хлорофилла *a* и хлорофилла *b*, каротиноидов и хлорофиллов. Изучено влияние изменения температуры культивирования на рост и развитие проростков. В качестве показателей роста использовали длину корней, длину пластинки и влагища первого листа, абсолютно сухую массу корневой системы и побега; рассчитывали показатель корнеобеспеченности проростка. Выделены сорта, на рост и развитие проростков которых влияние изменения температуры культивирования в пределах оптимальных значений не существенно. Установлено, что при изменении температуры соотношение длины листовой пластинки и влагища изученных сортов (за некоторым исключением) не изменяется. Проведенное исследование создает некоторые перспективы для регулирования продукционного процесса твердой пшеницы с учетом сортоспецифичности.

Ключевые слова: пшеница, устойчивость, рост и развитие, корневая система, содержание пигментов.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-412-418>

Твердая пшеница – ценная продовольственная культура – одна из важнейших с экономической точки зрения. Она является второй значимой культурой после мягкой для многих стран, а мировое производство зерна достигает 15–20 млн т [1]. Несмотря на сокращение ее посевов в последние десятилетия, в нашей стране интерес к изучению сортовых особенностей роста и развития этой культуры возрастает [2–4].

Сельскохозяйственные растения, произрастающие в средней полосе, в процессе онтогенетического развития довольно часто подвергаются



колебаниям температуры [5], что отражается на их жизнедеятельности и продуктивности [6]. Сведения о требованиях сельскохозяйственных культур к температурному режиму могут быть использованы для определения оптимальных сроков сева, в агроклиматическом обосновании районирования сортов, в прогнозировании и программировании урожая [7, 8].

Материалы и методы

Исследования проведены на кафедре микробиологии и физиологии Саратовского национального исследовательского государственного университета. Объекты исследования – сорта яровой твердой пшеницы *Triticum durum* L.

Семена одного года репродукции (всхожесть $\geq 90\%$) помещали в стаканчики, заполненные вермикулитом. Культивирование осуществлялось в климатической камере при двух температурных режимах – $15\pm 1^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$. Данные значения лежат в пределах оптимального для роста и развития пшеницы температурного интервала. Через 10 дней от начала эксперимента измеряли длину корневой системы, определяли абсолютно сухую массу корневой системы и побега ($n = 20$), вычисляли показатель корнеобеспеченности проростков пшеницы [9]. Изучение влияния температуры культивирования на развитие фотосинтетического аппарата проводили на двухнедельных растениях: измеряли длину пластинки и влагища первого листа ($n = 20$), спектрофотометрическим методом определяли количественное содержание каротиноидов, хлорофиллов *a* и *b* [10]. Обработку данных проводили по Доспехову [11].

Результаты и их обсуждение

Жизнеспособность проростка во многом определяется развитием корневой системы. Морфометрическое исследование корневой системы позволило разделить объекты изучения на две группы. К первой группе относятся сорта, для роста корней которых более благоприятной является температура культивирования $20\pm 2^\circ\text{C}$. Так, длина корневой системы проростков сорта Елизаветинская при $20\pm 2^\circ\text{C}$ составила 743 мкм,



что на 237 мкм превысило аналогичное значение при более низкой температуре (рис. 1). Длина корневой системы проростков Безенчукская 210, Луч 25, Харьковская 23 при $20\pm 2^\circ\text{C}$ на 29–30% больше, чем при $15\pm 1^\circ\text{C}$. Стимулирующее действие более высокой температуры культивирования на рост корневой системы в длину отмечено также у проростков сортов Памяти Чеховича, Кубанка, Саратовская золотистая, Людмила, Лилёк, Аннушка, длина корней проростков этих

сортов, культивированных при $20\pm 2^\circ\text{C}$, на 11–22% выше аналогичных значений при $15\pm 1^\circ\text{C}$.

Ко второй группе отнесены сорта, для развития корневой системы которых более благоприятной оказалась температура $15\pm 1^\circ\text{C}$: длина корневой системы при этой температуре культивирования на 23–30% больше у сортов Краснокутка 6, Краснокутка 10, Крассар и НИК; на 8–12% выше у проростков сортов Алейская, Валентина.

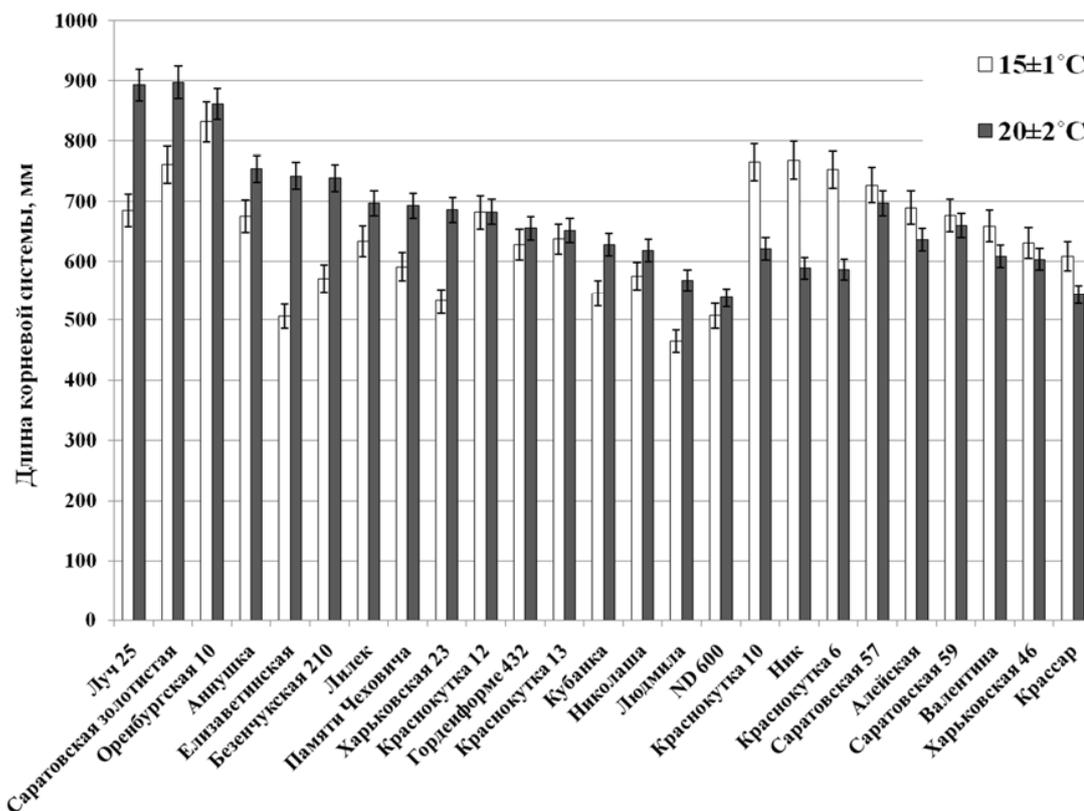


Рис. 1. Влияние температуры культивирования на рост корневой системы проростков яровой твердой пшеницы

Для проростков сортов Саратовская 57, Саратовская 59, Харьковская 46, Гордеиформе 432, Краснокутка 13, Краснокутка 12, Оренбургская 10, ND 600, Николаша различия данного параметра в условиях эксперимента являются статистически недостоверными.

Одним из показателей развития проростка является его корнеобеспеченность как соотношение абсолютно сухих масс корневой системы и побега. Установлена связь между данным показателем и устойчивостью растений к неблагоприятным условиям окружающей среды [12, 13].

Повышение показателя корнеобеспеченности проростка при более низкой температуре культивирования выявлено у большей части

изученных нами сортов (рис. 2). Зависимость данного показателя от температурного режима в большей степени проявилась у сортов Валентина, Краснокутка 6, Гордеиформе 432: корнеобеспеченность проростков, культивированных при температуре $15\pm 1^\circ\text{C}$, в два раза больше, чем при температуре $20\pm 2^\circ\text{C}$.

Исключение составили проростки сорта Оренбургская 10, характеризующиеся повышением корнеобеспеченности при температуре $20\pm 2^\circ\text{C}$, и сортов, для которых не выявлено существенной зависимости между данным показателем и температурой культивирования – Николаша, Елизаветинская, ND 600, Аннушка, Саратовская золотистая, Людмила.

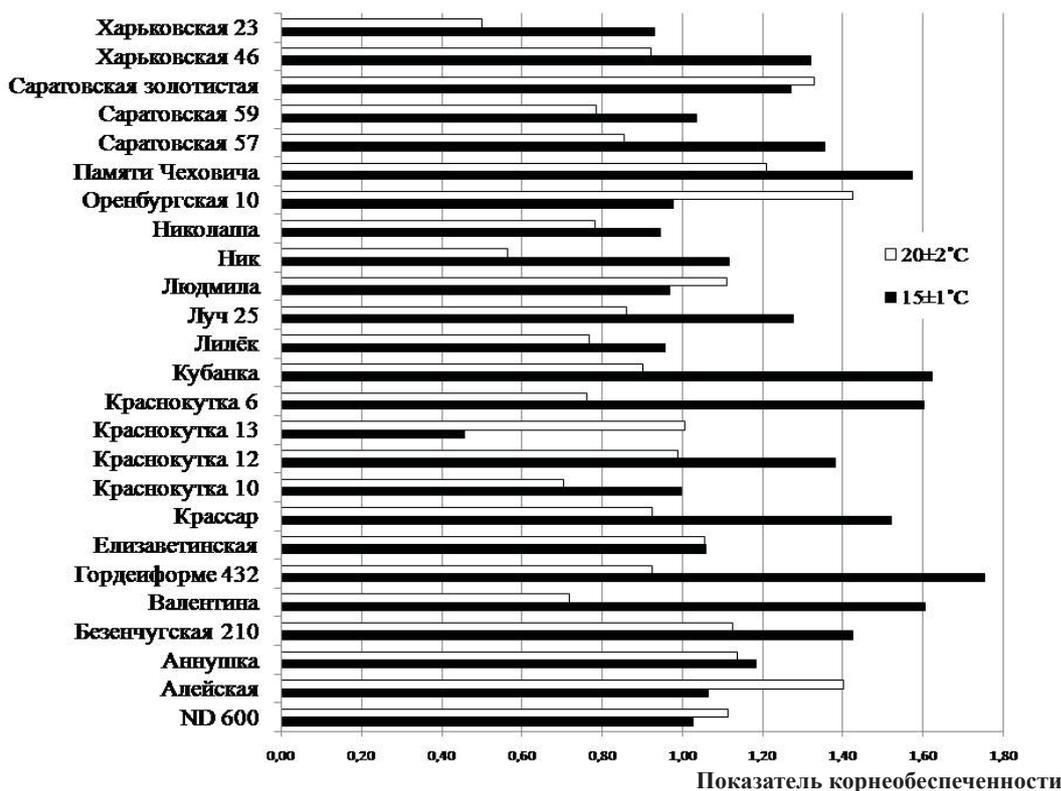


Рис. 2. Влияние температуры культивирования на величину корнеобеспеченности проростков твердой пшеницы

На основании проведенного исследования установлено, что температура $15\pm 1^\circ\text{C}$ благоприятна для роста пластинки и влагалища первого листа проростков сортов Краснокутка 12, НИК, Николаша, Оренбургская 10, Памяти Чеховича. Положительный эффект этой температуры культивирования отмечен в отношении листового влагалища проростков сорта Саратовская 57, тогда как длина пластинки листа оказалась на 11% меньше, чем при более высокой температуре. Первый лист проростков остальных изученных нами сортов имел большую длину при $20\pm 2^\circ\text{C}$.

Необходимо отметить, что при изменении температуры культивирования проростков в оптимальном для пшеницы диапазоне соотношение длины листовой пластинки и влагалища изученных сортов (за исключением Памяти Чеховича и Саратовская 57) не изменяется. У растений сорта Алейская длина влагалища составила 19–20% от всей длины листа, у сорта НИК – 24–25%, у остальных сортов – от 30 до 40%.

Одним из показателей активности фотосинтетического аппарата является количественное содержание пигментов и соотношение их форм в пигментном комплексе [14,15]. Данные об изме-

нении содержания и соотношения хлорофиллов и каротиноидов несут важную информацию о структурных перестройках фотосинтетического аппарата [16].

Выявлены сорта, для которых характерно повышение содержания хлорофилла *a* в пластинке первого листа проростков при более низкой температуре, – это Оренбургская 10, Краснокутка 12, Гордеиформе 432, Лилёк, Николаша, Аннушка, Луч 25, Харьковская 23, Елизаветинская, Валентина, Саратовская 57, Крассар (рис. 3, 4). Количественное содержание хлорофилла *b* в пластинке первого листа проростков этих сортов, культивированных при температуре $15\pm 1^\circ\text{C}$, также превышает аналогичные значения при температуре культивирования $20\pm 2^\circ\text{C}$. Исключение составил сорт Лилёк, для которого повышение температуры культивирования до $20\pm 2^\circ\text{C}$ сопровождалось повышением содержания хлорофилла *b* в 1,6 раза.

Для других исследованных нами сортов твердой пшеницы характерно повышение количественного содержания зеленых пигментов при более высокой температуре культивирования (см. рис. 3, 4). В значительной степени этот эффект проявился у сортов ND 600 и Памяти Чеховича: культивирование при температуре $20\pm 2^\circ\text{C}$ привело к повышению содержания хлорофилла *a*

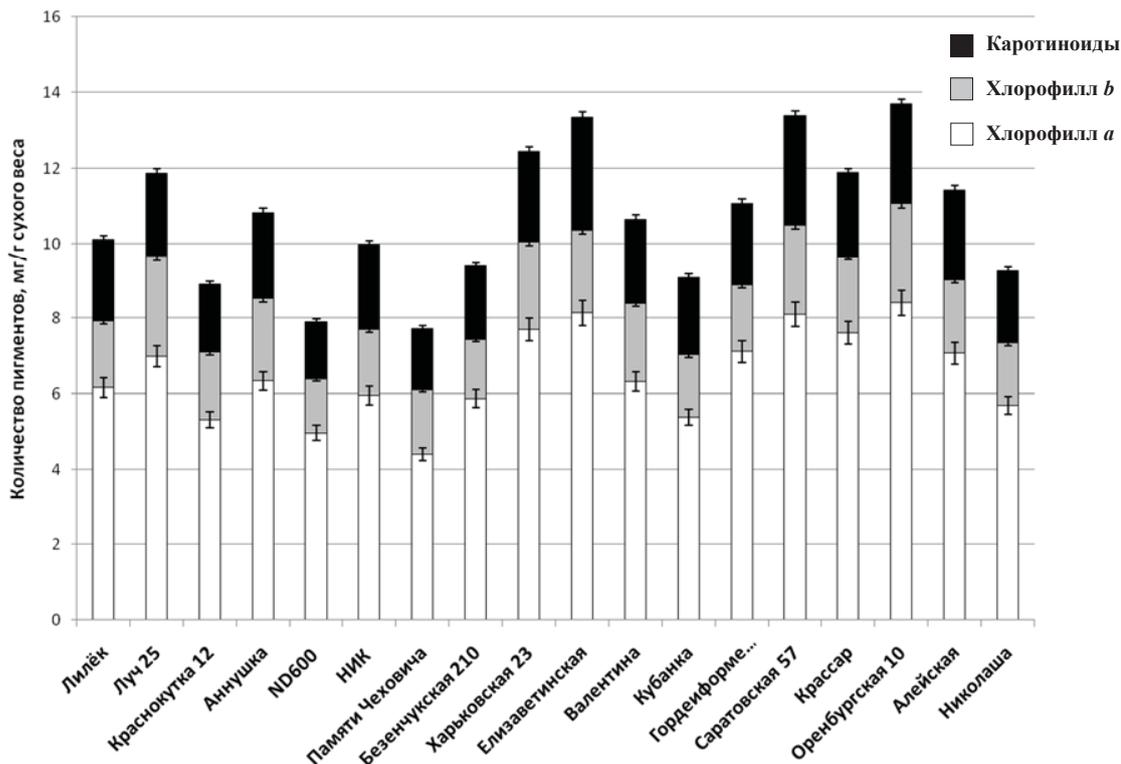


Рис. 3. Содержание пигментов в пластинке первого листа проростков твердой пшеницы при температуре культивирования 15±1°C

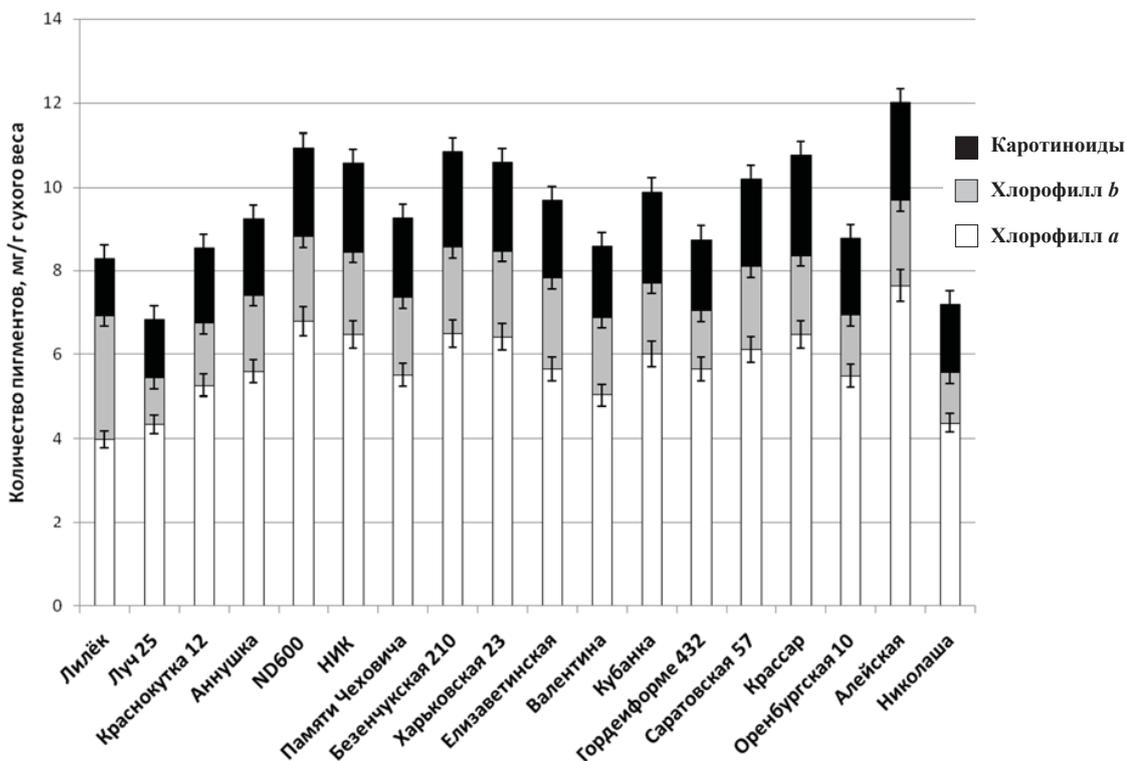


Рис. 4. Содержание пигментов в пластинке первого листа проростков твердой пшеницы при температуре культивирования 20±2°C



на 36% и 25% по сравнению с проростками, культивированными при $15\pm 1^\circ\text{C}$. У проростков сортов Алейская, Кубанка, Безенчукская 210 и НИК наблюдается повышение количества хлорофилла *a* на 7–11%. Понижение температуры культивирования проростков этой группы сортов до $15\pm 1^\circ\text{C}$ приводит к снижению количественного содержания хлорофилла *b* на 25–30% у проростков сортов Безенчукская 210 и ND 600, у других сортов этой группы – на 4–11%.

Увеличение доли хлорофилла *b* свидетельствует о повышении светособирающей способности фотосинтезирующих тканей в области дальнего красного света [17]. Соответственно отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* (*a/b*) определяет способность растений адаптироваться к изменениям освещенности, позволяя скоординировать распределение ресурсов для достижения и поддержания оптимальных скоростей фотосинтеза [18].

На основании полученных данных выделены сорта, для проростков которых характерно увеличение соотношения хлорофиллов *a* и *b* в ответ на повышение температуры культивирования. Так, соотношение зеленых пигментов у проростков сорта Луч 25, выращенных при $20\pm 2^\circ\text{C}$, в 1,5 раза выше, чем при $15\pm 1^\circ\text{C}$, у проростков сортов Краснокутка 12, Памяти Чеховича, Оренбургская 10 на 14–20% выше. Для сортов Аннушка, Кубанка, Алейская, Николаша изменения данного показателя менее значительны или не существенны (разница составляет 3–6% по сравнению с аналогичными значениями при $15\pm 1^\circ\text{C}$). У других исследованных сортов твердой пшеницы в условиях более высокой температуры соотношение зеленых пигментов снижается.

Количественное соотношение каротиноидов и хлорофиллов (Кар/Хл) часто применяют для оценки стрессоустойчивости зеленых растений [19]. Учитывая роль каротиноидов в защите фотосинтетического аппарата в условиях стресса, увеличение значения этого показателя указывает на повышение устойчивости объекта при неблагоприятных условиях [20].

Максимальные значения Кар/Хл характерны для пластинки первого листа проростков сортов НИК, Елизаветинская, Кубанка (при температуре $15\pm 1^\circ\text{C}$) и сортов Крассар, Николаша (при $20\pm 2^\circ\text{C}$).

Необходимо отметить, что изменение температуры культивирования проростков в оптимальном для пшеницы диапазоне не влияет или влияет незначительно на соотношение Кар/Хл в пластинке первого листа проростков сортов ND 600, Безенчукская 210, Памяти Чеховича,

Харьковская 23, Кубанка, Гордеиформе 432, Саратовская 57. Культивирование при температуре $15\pm 1^\circ\text{C}$ способствует повышению содержания каротиноидов, относительно содержания хлорофиллов, у проростков сортов Лилёк, Аннушка, НИК, Елизаветинская, Валентина, Алейская. У других исследованных нами сортов при повышении температуры культивирования соотношение Кар/Хл увеличивается.

Среди сортов, реагирующих на изменение температурного режима изменением соотношения каротиноидов и хлорофиллов, выделены сорта с существенным изменением данного показателя. Наибольшие отличия соотношения каротиноидов и хлорофиллов характерны для сорта Лилёк (при $15\pm 1^\circ\text{C}$ соотношение пигментов на 36% выше, чем при $20\pm 2^\circ\text{C}$). На 20–23% различаются значения Кар/Хл у сортов Крассар (показатель имеет более высокое значение при $20\pm 2^\circ\text{C}$) и Елизаветинская (соотношение каротиноидов и хлорофиллов выше при $15\pm 1^\circ\text{C}$). При этом у большинства сортов, реагирующих на изменение температурного режима изменением соотношения каротиноидов и хлорофиллов, отличия данного показателя в условиях эксперимента составили 6–13%.

Заключение

Изучено влияние температуры культивирования в пределах оптимальных для яровой пшеницы значений на рост и развитие проростков сортов твердой пшеницы. Для развития корневой системы проростков некоторых сортов благоприятной оказалась температура $15\pm 1^\circ\text{C}$ (сорта Алейская, Валентина, Крассар, Краснокутка 10, Краснокутка 6, НИК). Температура $20\pm 2^\circ\text{C}$ оказала положительное действие на рост корневой системы проростков сортов Елизаветинская, Кубанка, Лилёк, Памяти Чеховича, Аннушка, Людмила, Саратовская золотистая, Харьковская 23, Луч 25, Безенчукская 210. Для роста и пластинки, и влагалища первого листа проростков сортов Краснокутка 12, Николаша, Оренбургская 10, Памяти Чеховича, НИК благоприятна температура $15\pm 1^\circ\text{C}$. Первый лист проростков других изученных нами сортов большие значения имел при температуре культивирования $20\pm 2^\circ\text{C}$.

Определены сорта, которые на понижение температуры культивирования реагируют снижением содержания хлорофиллов и каротиноидов: ND 600, Памяти Чеховича, Безенчукская 210, Кубанка. У проростков сортов Крассар и Краснокутка 12 повышение содержания зеленых пигментов сопровождается снижением количества каротиноидов. Для сорта Елизаве-



тинская и Валентина при более низкой температуре культивирования наблюдается увеличение всех показателей – количественного содержания зеленых пигментов, каротиноидов, соотношения хлорофиллов *a* и *b*, хлорофиллов и каротиноидов.

Изменение температурного режима культивирования не оказывает существенного влияния на соотношение каротиноидов и хлорофиллов в пластинке первого листа проростков сортов ND 600, Безенчукская 210, Памяти Чеховича, Харьковская 23, Кубанка, Гордеиформе 432, Саратовская 57. Тогда как для сортов Лилёк, Крассар, Елизаветинская изменения значения данного показателя существенны.

Список литературы

1. *Вошедский Н. Н., Гринько А. В.* Выращивание яровой твердой пшеницы в условиях Ростовской области // Изв. Оренб. гос. аграр. ун-та. 2016. № 3. С. 23–27.
2. *Goldringer I., Provin C., Rousset M., Galic N., Bonnin I.* Rapid differentiation of experimental populations of wheat for heading time in response to local climatic conditions // *Annals of Botany*. 2006. Vol. 98, № 4. P. 805–817.
3. *Танайлова Е. А., Тимирова С. И., Коробко В. В.* Сортовые особенности анатомической организации клеток алейронового слоя зерновки твердой пшеницы // Вавиловские чтения-2007 : материалы конф. Саратов, 2007. С. 56–57.
4. *Коробко В. В., Степанов С. А.* Влияние температуры на развитие корневой системы проростков твердой пшеницы // Вопросы биологии, экологии, химии и методики обучения : сб. науч. ст. Саратов, 2017. Вып. 19. С. 3–6.
5. *Лархер В.* Экология растений. М., 1978. 383 с.
6. *Трунова Т. И.* Растение и низкотемпературный стресс. М., 2007. 54 с.
7. *Коробко В. В., Шевлягина О. Ф., Степанов С. А.* Влияние температуры на развитие фотосинтетического аппарата проростков твердой пшеницы // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. 2017. Т. 15, вып. 3. С. 50–57.
8. *Козлов Г. И.* Влияние пониженных температур осени и весны на рост, развитие и урожай яровой и озимой пшеницы. URL: <http://www.dissercat.com/content/vliyanie-ponizhennykh-temperatur-oseni-ivesny-na-rost-razvitie-i-urozhai-yarovoi-i-ozimoi-p-ixzz4B8hsqU3m> (дата обращения: 02.04.2018).
9. *Голуб Н. А.* Параметры первичной корневой системы озимой пшеницы и возможности их использования в оценке сортов // Физиология продуктивности и устойчивости зерновых культур : сб. науч. тр. Краснодар, 1988. С. 42–47.
10. *Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В.* Большой практикум по фотосинтезу. М., 2003. 256 с.
11. *Доспехов Б. А.* Методика полевого опыта. 2-е изд., перераб. и доп. М., 1986. 336 с.
12. *Коробко В. В., Волков Д. П.* Устойчивость некоторых сортов зернового сорго к разнокачественному засолению // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 2. С. 107–111.
13. *Лисицин Е. М.* Методика лабораторной оценки алюмоустойчивости зерновых культур // Докл. РАСХН. 2003. № 3. С. 5–7.
14. *Алиев Д. А., Азизов И. В., Казибекова Э. Г.* Фотосинтетическая способность и развитие хлоропластов в онтогенезе пшеницы. Баку, 1988. 116 с.
15. *Maslova T. G., Popova I. A.* Adaptive properties of the plant pigment systems // *Photosynthetica*. 1993. Vol. 29. P. 195–203.
16. *Garnik E. Yu., Deeva D. V., Belkov V. I., Tarasenko V. I., Konstantinov Yu. M.* The effects of light intensity on development and chlorophyll content in the Arabidopsis thaliana mutant plants with defects in photosynthesis // *J. of Stress Physiology and Biochemistry*. 2015. Vol. 11, № 4. P. 58–67.
17. *Ivanov L. A., Ivanova L. A., Ronzhina D. A., Yudina P. K.* Changes in the chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of steppe plants along a latitudinal gradient in South Ural // *Russ. J. of Plant Physiology*. 2013. Vol. 60, № 6. P. 812–820.
18. *Valladares F., Zaragoza-Castells J., Sanchez-Gomez D., Matesanz S., Alonso B., Portsmouth A., Delgado A., Atkin O. K.* Is shade beneficial for mediterranean shrubs experiencing periods of extreme drought and late-winter frosts? // *Annals of Botany*. 2008. Vol. 102, № 6. P. 923–933.
19. *Смоликова Г. Н., Ламан Н. А., Борискевич О. В.* Роль хлорофиллов и каротиноидов в устойчивости семян к абиотическим стрессорам // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 817–825.
20. *Мокроносков, А. Т., Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В.* Фотосинтез : Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М., 2006. 448 с.

Influence of the Cultivation Temperature on Morphometric and Functional Indices of Growth *Triticum durum* L.

V. V. Korobko, O. F. Shevlyagina

Valeria V. Korobko, <https://orcid.org/0000-0002-0444-8238>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, v.v.korobko@mail.ru

Olesya F. Shevlyagina, <https://orcid.org/0000-0001-8415-4610>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, oshevlyagina@mail.ru

The object of the study was sprouts of durum wheat *Triticum durum* L. Cultivation was carried out at a temperature of $15 \pm 1^\circ\text{C}$ and



20 ± 2°C. To study the influence of the temperature factor on the development of the photosynthetic apparatus, the quantitative content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids was determined. Some varieties, when subjected to a change in the temperature of cultivation, respond with a change in the indices determining their stress tolerance, namely the ratio of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, carotenoids and chlorophylls. The effect of changing the temperature of cultivation on the growth and development of seedlings was studied. As growth indicators, the length of the roots, the length of the first leaf, the absolutely dry mass of roots and shoots were

used; the index of root supply was calculated. Varieties have been identified for the growth and development of plants whose effect of changing the culture temperature within the optimal values is not significant. It has been established that when the temperature of cultivation varies, the ratio of the parts of the leaf of the studied varieties (with some exceptions) does not change. The conducted research creates some prospects for regulating the production process of hard wheat, taking into account variety-specificity.

Key words: wheat, resistance, growth and development, root system, pigment content.

Образец для цитирования:

Коробко В. В., Шевлягина О. Ф. Влияние температуры культивирования на морфометрические и функциональные показатели роста *Triticum durum* L. // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 412–418. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-412-418>

Cite this article as:

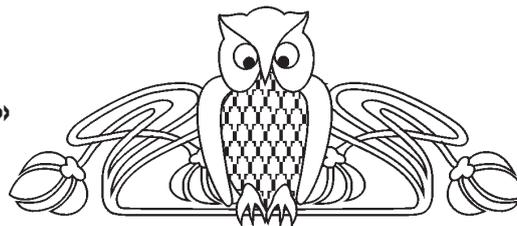
Korobko V. V., Shevlyagina O. F. Influence of the Cultivation Temperature on Morphometric and Functional Indices of Growth *Triticum durum* L. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 412–418 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-412-418>



УДК 582.29 (470.44)

ЭПИФИТНЫЕ ЛИШАЙНИКИ ПРИРОДНОГО ПАРКА «КУМЫСНАЯ ПОЛЯНА»

Е. А. Козырева, В. А. Болдырев



Козырева Елена Алексеевна, аспирант, ведущий инженер кафедры ботаники и экологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, lichens.sarat@mail.ru

Болдырев Владимир Александрович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники и экологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, boldyrevva@info.sgu.ru

В статье приводятся сведения об эпифитной лишайнофлоре природного парка «Кумысная поляна», располагающегося на территории города Саратова и являющегося ООПТ регионального значения. Исследования проводились в лесных сообществах ПП в 2011–2016 гг. При сборе, гербаризации и определении лишайников пользовались стандартными методиками. Рассчитывался индекс видоспецифичности видового состава лишайников для форофитов. Был составлен аннотированный список из обнаруженных 37 видов с указанием форофитов, на которых они обитают. В основном эпифитная лишайнофлора представлена листоватыми и накипными лишайниками (18 и 13 видов соответственно). Самые высокие значения проективного покрытия отмечены у *Physconia enteroxantha* (до 93%). В большинстве фитоценозов встречаются *Melanelia glabra*, *Parmelia sulcata* и *Physconia enteroxantha*. Выяснено, что *Quercus robur* является наиболее предпочитаемым форофитом, на котором встречается 26 видов лишайников. Также у него отмечено самое высокое значение индекса видоспецифичности – 0.30. В связи с массовым усыханием деревьев дуба и постоянно увеличивающейся антропогенной нагрузкой под угрозу исчезновения попадают виды, предпочитающие *Quercus robur* в качестве основного форофита. В более выгодной ситуации оказываются эвритопные виды (*Parmelia sulcata*, *Physcia adsdens*, *Physconia enteroxantha*, *Xanthoria parietina*), которые могут поселяться на других видах деревьев. На территории ПП обнаружена *Pseudevernia furfuracea*, рекомендованная к внесению в новое издание Красной книги Саратовской области. **Ключевые слова:** лишайники, природный парк, Кумысная поляна, эпифиты, Саратов.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-419-422>

Природный парк «Кумысная поляна» (ПП) располагается в западной части Саратова и имеет статус комплексной (биологической, геологической, ландшафтной) ООПТ регионального значения [1, 2]. Целью образования в 1991 г. этого ПП являлось сохранение и поддержание уникального природного пригородного лесного массива, а также создание условий для отдыха горожан.

ПП занимает территорию площадью 3987 га на Лысогорском останцовом массиве Приволж-

ской возвышенности с абсолютной отметкой в 280 м. Плоские водораздельные пространства центральной части сочетаются с расчленёнными склонами плато, изрезанными балками и оврагами. Лысогорское плато высоко поднято над долиной Волги, что способствует формированию умеренного климата [3]. Территория не расчленена элементами гидросети, но имеются пруды, ручьи и родники. На территории ПП распространены черноземы обыкновенные и выщелоченные (на открытых площадях), серые лесные почвы (под пологом леса).

На Лысогорском плато распространена лесная, луговая и степная растительность при преобладании первой. Лесные сообщества образованы в основном шестью видами деревьев: *Quercus robur*, *Acer platanoides*, *Tilia cordata*, *Betula pendula*, *Ulmus laevis*, *Populus tremula*. В ярусе кустарников преобладают *Amygdalus nana*, *Cerasus fruticosa*, *Euonymus verrucosa*, *Spiraea crenata*, в травяном покрове – *Aegopodium podagraria*, *Convallaria majalis*, *Elytrigia repens*, *Lathyrus pisiformis*, *Poa nemoralis*, *Stellaria angustifolia* и др. Лесные фитоценозы испытывают антропогенное воздействие, приводящее к уменьшению доли лесных и луговых видов и увеличению степных [1, 4].

Первые сведения о лишайниках Саратова и его окрестностей встречаются в работах А. А. Еленкина (1906–1911) [5], в которых для города по сборам А. Я. Тугаринова и Б. А. Келлера описано девятнадцать видов. Позже Д. Е. Янишевский (1918, 1934) [6, 7] приводит одиннадцать видов для окрестностей Саратова (часть образцов хранится в гербарии СГУ имени Н. Г. Чернышевского (SARAT)). В основном это эпигейные лишайники. Позже после значительного перерыва в лишайнологических исследованиях появляются публикации, в которых городская лишайнофлора отдельно не рассматривается, но является частью более крупного исследования [8–10]. В них для территории ПП указывается 21 вид. В этом же году приводится список из 12 видов лишайников, встреченных в парке [11]. В последней публикации [12] лишайники ПП рассматриваются как индикаторы загрязнения окружающей среды.



Материалы и методы

Материалами для данной работы послужили личные сборы первого автора 2011–2016 гг., коллекция лишайников гербария SARAT, литературные сведения [10]. Материал собирался в лесных сообществах. Определение образцов проводилось по стандартным методикам [13]. Номенклатура таксонов дана в соответствии со сводкой «Santesson's online checklist of Fennoscandian lichen-forming and lichenicolous fungi» [14] и С. К. Черепанова [15]. Индекс видоспецифичности видового состава лишайников рассчитывался как отношение числа специфических видов одного форофита к общему числу видов, обнаруженных на всех [16].

Результаты и их обсуждение

Ниже представлен аннотированный список эпифитных лишайников, обнаруженных на исследованной территории. Названия видов даны в алфавитном порядке, указаны местообитания и заселяемые видом форофиты. Звездочкой (*) отмечены виды, ранее не обнаруженные на территории ПП.

Аннотированный список

1. *Amandinea punctata* (Hoffm.) Coppins et Scheid. – На коре *Quercus robur* в лиственных лесах.
2. **Anaptychia ciliaris* (L.) Körb. – На коре *Tilia cordata* в лиственных лесах.
3. *Anisomeridium polypori* (Ellis et Everh.) M. E. Barr – На коре *Populus tremula*, *Quercus robur* в лиственных лесах.
4. *Athallia pyracea* (Ach.) Arup, Frödén & Søchting – На коре *Populus tremula* в лиственных лесах.
5. *Candelariella xanthostigma* (Ach.) Lettau – На коре *Quercus robur*, *Populus tremula* в лиственных лесах.
6. *Cladonia chlorophaea* (Flörke ex Sommerf.) Spreng. – На комлевой части *Quercus robur* в дубравах.
7. *Cladonia coniocraea* (Flörke) Spreng. – На комлевой части *Quercus robur* в дубравах.
8. *Evernia mesomorpha* Nyl. – На коре *Quercus robur* в лиственных лесах.
9. *Evernia prunastri* (L.) Ach. – На коре *Quercus robur* в дубравах.
10. *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. – На коре *Tilia cordata*, *Betula pendula* в клено-липняках с примесью дуба и березы.
11. *Lecanora albellula* (Nyl.) Th. Fr. – На коре *Quercus robur*, *Populus tremula*, в лиственных лесах.
12. *Lecanora allophana* Nyl. – На коре *Quercus robur* в дубравах.
13. *Lecanora carpinea* (L.) Vain. – На коре *Tilia cordata*, *Populus tremula* в лиственных лесах.
14. *Lecanora chlarotera* Nyl. – На коре *Quercus robur*, *Populus tremula* в лиственных лесах.
15. *Lecanora populicola* (DC.) Duby – На коре *Populus tremula* в лиственных лесах.
16. **Lecanora varia* (Hoffm.) Ach. – На коре *Quercus robur* в дубравах.
17. *Leptorhaphis atomaria* (Ach.) Szatala – На коре *Populus tremula* в лиственных лесах.
18. *Melanelixia glabra* (Schaerer) O. Blanco et al. – На коре *Acer tataricum*, *Betula pendula*, *Quercus robur* в лиственных лесах.
19. *Melanelixia subargintifera* (Nyl.) O. Blanco et al. – На коре *Tilia cordata*, *Quercus robur* в лиственных лесах.
20. *Melanohalea exasperata* (De Not) O. Blanco et al. – На коре *Quercus robur* в лиственных лесах.
21. *Parmelia sulcata* Taylor. – На коре *Acer platanoides*, *A. tataricum*, *Betula pendula*, *Populus tremula*, *Quercus robur*, *Tilia cordata* в лиственных лесах.
22. *Phaeophyscia nigricans* (Flörke) Moberg. – На коре *Acer tataricum*, *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Quercus robur* в лиственных лесах.
23. *Phaeophyscia orbicularis* (Neck.) Moberg. – На коре *Acer tataricum*, *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Quercus robur* в лиственных лесах.
24. *Physcia adsensens* (Fr.) H. Olivier – На коре *Acer platanoides*, *A. tataricum*, *Populus tremula*, *Quercus robur*, *Tilia cordata* в лиственных лесах.
25. *Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Fűrnr. – На коре *Populus tremula*, *Quercus robur* в лиственных лесах.
26. *Physcia stellaris* (L.) Nyl. – На коре *Acer tataricum*, *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Quercus robur* в лиственных лесах.
27. *Physconia deterosa* (Nyl.) Poelt. – На коре ствола *Tilia cordata* в клено-липняке с примесью дуба и березы.
28. *Physconia distorta* (With) J. R. Laundon. – На коре *Populus tremula*, *Quercus robur*, *Tilia cordata* в лиственных лесах.
29. *Physconia enteroxantha* (Nyl.) Poelt. – На коре *Acer platanoides*, *A. tataricum*, *Betula pendula*, *Populus tremula*, *Quercus robur*, *Tilia cordata* в лиственных лесах.
30. *Physconia perisidiosa* (Erichsen) Moberg. – На коре ствола *Tilia cordata* в клено-липняке с примесью дуба и березы.



31. *Pleurosticta acetabulum* (Neck.) Elix & Lumbsch. – На коре *Quercus robur* в лиственных лесах.

32. *Polycauliona polycarpa* (Hoffm.) Frödén et al. – На коре *Fraxinus excelsior* в ясеневых посадках.

33. *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. – На коре *Quercus robur* в лиственных лесах.

34. **Rinodina pyrina* (Ach.) Arnold – На коре *Populus tremula* на отдельно стоящих деревьях.

35. **Scoliciosporum chlorococcum* (Graewe ex Stenh.) Vězda – На коре *Quercus robur* в дубравах.

36. *Xanthomendoza fallax* (Hepp) Søchting et al. – На коре *Populus tremula*, *Quercus robur* в лиственных лесах.

37. *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. – На коре *Acer platanoides*, *A. tataricum*, *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula*, *Tilia cordata*, *Quercus robur* в лиственных лесах.

Составленный список включает 37 видов из 24 родов и 7 семейств. Среди них отмечено четыре вида, новых для территории парка: *Anaptychia ciliaris*, *Lecanora varia*, *Rinodina pyrina*, *Scoliciosporum chlorococcum*.

Ведущими по числу видов в лишайнофлоре ПП являются семейства Parmeliaceae и Physciaceae, что типично для лесных экосистем. По ходу маршрутов чаще других были встречены представители семейств Parmeliaceae и Physciaceae. Самым широко встречающимся и обильным видом является *Physconia enteroxantha*, что объясняется ее высокой устойчивостью и пластичностью в городской среде.

Из обнаруженных лишайников шесть являются кустистыми, восемнадцать – листоватыми и тринадцать – накипными.

Самые высокие показатели проективного покрытия видов в клено-липняке имеют *Physconia enteroxantha* (93%), в дубраве – *Parmelia sulcata* (до 63), в дубо-кленовнике – *Melanelixia glabra* (до 35), *M. subargentifera* (42) и *Phaeophyscia orbicularis* (42%). *Melanelixia glabra*, *Parmelia sulcata* и *Physconia enteroxantha* встречаются в большинстве фитоценозов.

Наиболее предпочтительным форофитом является *Quercus robur*, на котором встречается 70% видов, наименее – *Acer platanoides*, *Betula pendula*, *Fraxinus excelsior* (11, 14 и 14% соответственно). Самое высокое значение индекса видоспецифичности показателя отмечается у *Quercus robur* (таблица).

Число видов и индекс видоспецифичности видового состава лишайников для форофитов ПП

Показатель	Форофит						
	<i>Tilia cordata</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Acer platanoides</i>	<i>Acer tataricum</i>	<i>Populus tremula</i>	<i>Quercus robur</i>	<i>Betula pendula</i>
Общее число видов	11	5	4	8	19	26	5
Индекс видоспецифичности	0,08	0,03	0,00	0,00	0,11	0,30	0,00

На *Betula pendula* и представителях рода *Acer* специфичных видов не обнаружено вовсе.

В связи с тем что в последние десятилетия отмечается массовое усыхание деревьев *Quercus robur* на фоне возрастающего уровня антропогенного воздействия, наблюдается тенденция изменений условий обитания живых организмов, в том числе эпифитных лишайников. Такая смена субстрата неизменно ведет к уменьшению или даже исчезновению ряда видов, в основном стенобионтных либо находящихся в неблагоприятных условиях. Вероятнее всего могут исчезнуть лишайники *Amandinea punctata*, *Evernia mesomorpha*, *Leptorhaphis atomaria* и др., приуроченные к *Quercus robur*. В более выгодной ситуации оказываются эвритопные виды: *Parmelia sulcata*, *Physcia adsensens*, *Physconia enteroxantha*, *Xanthoria parietina*.

На территории ПП обнаружена *Pseudevernia furfuracea*, рекомендованная к внесению в новое издание Красной книги Саратовской области [17], сборы которой хранятся в гербарии SARAT.

Список литературы

1. Особо охраняемые природные территории Саратовской области : национальный парк, природные микрорезерваты, памятники природы, дендрарий, ботанический сад, особо охраняемые геологические объекты / науч. ред. В. З. Макаров. Саратов : Изд-во Сарат. ун-та, 2007. 300 с.
2. Учебно-краеведческий атлас Саратовской области / гл. ред. А. Н. Чумаченко. Саратов : Изд-во Сарат. ун-та, 2013. 144 с.
3. Пряхина С. И. Климат Саратовской области // Энциклопедия Саратовского края (в очерках, фактах, событиях, лицах). Саратов : Приволж. кн. изд-во, 2002. С. 24–28.



4. Болдырев В. А., Далматов Н. Б., Степанов М. В. Экологическая оценка рекреационной нарушенности плакорных лесов пригородной зоны Саратова // Изв. Саратов. ун-та. Спец. вып. Сер. Биологическая. 2001. С. 24.
5. Еленкин А. А. Флора лишайников Средней России : в 4 ч. Юрьев : Типография К. Маггисена, 1906–1911. 684 с.
6. Янишевский Д. Е. К флоре Саратовского уезда // Сельскохозяйственный вестн. Юго-Востока. 1918. № 3–5. С. 30–33.
7. Янишевский Д. Е. Из жизни тюльпанов на Нижней Волге // Советская ботаника. 1934. № 3. С. 72–103.
8. Дайковский В. С. Эпифлеоидные и эпигейные лишайники некоторых районов Правобережья Саратовской области // Вопросы ботаники Юго-Востока. Флора. Растительность. Физиология : междуз. науч. сб. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 1984. С. 97–99.
9. Шустов М. В. Лишайники Приволжской возвышенности. М. : Наука, 2006. 237 с.
10. Дудорева Т. А., Гимельбрант Д. Е., Козырева Е. А. Материалы к изучению лишенофлоры Приволжской возвышенности (в пределах Саратовской области) // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер. Биология и экология. 2013. Вып. 20, № 54. С. 92–106.
11. Елисов А. Н., Ерофеева И. А., Искра Т. Д. Лишайники основных древесных пород города Саратова (на примере природного парка Кумысная поляна) // Наука и технологии : шаг в будущее-2013 : материалы IX междунар. науч.-практ. конф. URL: http://www.rusnauka.com/7_NITSB_2013/Ecologia/6_130371.doc.htm (дата обращения: 08.04.2018).
12. Ерофеева И. А., Козырева Е. А. Содержание хлорофилла в талломах лишайников лесопарка «Кумысная поляна» // Materiały X Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji “Strategiczne pytania światowej nauki-2014”. Vol. 29. Ekologia. Geografia i geologia. Przemysł : Nauka i studia, 2014. S. 26–29.
13. Флора лишайников России : Биология, экология, разнообразие, распространение и методы изучения лишайников / отв. ред. М. П. Андреев, Д. Е. Гимельбрант. М. ; СПб. : Т-во науч. изд. КМК, 2014. С. 204–220.
14. Nordin A., Moberg R., Tønberg T., Vitikainen O., Dalsätt Å., Myrdal M., Snitting D., Ekman S. Santesson’s Checklist of Fennoscandian Lichen-forming and Lichenicolous Fungi. URL: <http://130.238.83.220/santesson/home.php> (дата обращения: 11.04.2018).
15. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб. : Мир и семья, 1995. 992 с.
16. Жданов И. С. Лишайники Кандалакшского горного массива (Мурманская область) : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. 23 с.
17. Болдырев В. А., Козырева Е. А., Костецкий О. В. Редкие и исчезающие виды грибов и лишайников, рекомендуемые для внесения в третье издание Красной книги Саратовской области // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 3. С. 299–301.

Epiphytic Lichens of Natural Park “Kumysnaya Polyana”

E. A. Kozyreva, V. A. Boldyrev

Elena A. Kozyreva, <https://orcid.org/0000-0001-5005-5008>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, lichens.sarat@mail.ru

Vladimir A. Boldyrev, <https://orcid.org/0000-0003-0322-3755>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, boldyrevva@info.sgu.ru

The article provides information about the epiphytic lichen flora of the Natural Park “Kumysnaya Polyana” (NP), which is located in Saratov. It is a regional SPNA (Special Protected Natural Area). The researches were conducted in forest communities of NP in 2011–2016. Standard techniques were used in the collection and identification of lichens. An index of species specificity of lichens for forophytes was calculated. An annotated list consists of 37 species and includes the information about their preferential forophytes. In general, the epiphytic lichen flora is represented by foliose and crustose lichens (18 and 13 species respectively). The highest projective cover values were noted to *Physconia enteroxantha* (up to 93%). *Melanelixia glabra*, *Parmelia sulcata* and *Physconia enteroxantha* are found in most phytocoenoses. It was found that *Quercus robur* is the most preferred forophyte, on which there are 26 species of lichens. It also noted the highest index of species value – 0.30. Due to the fact that there is widespread drying of oak trees and the constantly increasing anthropogenic pressures, species that prefer *Quercus robur* as the main forophyte are in danger of extinction. In a more favorable situation there are eurytopic species, such as *Parmelia sulcata*, *Physcia adsensens*, *Physconia enteroxantha*, *Xanthoria parietina*, which can inhabit other types of trees along with *Pseudevernia furfuracea*, that are recommended for inclusion in the new edition of the Red Book of the Saratov Region. These were found on the territory of the NP.

Key words: lichens, natural park, “Kumysnaya Polyana”, epiphytes, Saratov.

Образец для цитирования:

Козырева Е. А., Болдырев В. А. Эпифитные лишайники природного парка «Кумысная поляна» // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 419–422. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-419-422>

Cite this article as:

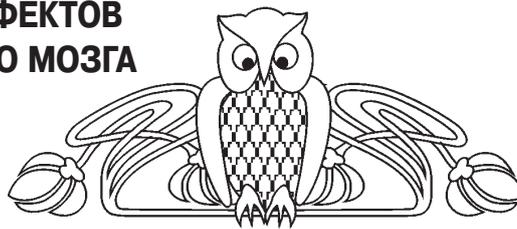
Kozyreva E. A., Boldyrev V. A. Epiphytic Lichens of Natural Park “Kumysnaya Polyana”. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 419–422 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-419-422>



УДК 612.82:616-073

ОПТИМИЗАЦИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ СОСУДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

О. В. Семякина-Глушковская, А. А. Широков, Н. А. Наволокин,
А. В. Терсков, А. А. Бодрова, Н. А. Шушунова, А. П. Хороводов,
М. В. Уланова, И. М. Агранович, Т. Д. Искра, А. Т. Мамедова



Семякина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой физиологии человека и животных, доцент, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, glushkovskaya@mail.ru

Широков Александр Александрович, кандидат биологических наук, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shirokov_a@ibppm.ru

Наволокин Никита Александрович, аспирант, ассистент кафедры патологической анатомии, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, nik-navolokin@yandex.ru

Терсков Андрей Витальевич, магистрант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, terskow.andrey@gmail.com

Бодрова Анастасия Алексеевна, магистрант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, nastya1535@mail.ru

Шушунова Наталия Александровна, магистрант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, shushunovan.a@gmail.com

Хороводов Александр Петрович, магистрант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, khorovodov2012@yandex.ru

Уланова Мария Васильевна, магистрант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, maru-ulanova@mail.ru

Агранович Илана Михайловна, аспирант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, ilana.agranovich@yandex.ru

Искра Татьяна Дмитриевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, tata-isk@yandex.ru

Мамедова Айсель Тофик кызы, магистрант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, mamedovaysel95@gmail.com

В экспериментах на здоровых мышах было установлено, что фотодинамическое воздействие (ФЗ) (635 нм с 5-аминолевулиновой кислотой – 5-АЛА) вызывает временное повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) к высокомолекулярным соединениям. Используя различные дозы лазерного излучения (635 нм, 10–40 Дж/см²) и концентрации фотосенсибилизатора 5-АЛА (20 и 80 мг/кг, *iv*) было установлено, что доза ФЗ (15 Дж/см²) является оптимальной для открытия ГЭБ без серьезных нарушений тканей и сосудов мозга. Дозы ФЗ (20–40 Дж/см²) не приводят к более выраженному повышению проницаемости ГЭБ, однако сопровождаются развитием сильного вазогенного отека и изменением формы сосудов. Полученные результаты являются важной информативной платформой для новых стратегий в развитии доставки лекарственных средств в мозг, а также для получения принципиально новых знаний о ФЗ эффектах на ткани и сосуды мозга.

Ключевые слова: фотодинамическое воздействие, гематоэнцефалический барьер, лазеры, проницаемость эндотелия.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-423-428>

Введение

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой комплекс белков, расположенный на эндотелиацитах микрососудов мозга, который контролирует движение различных веществ из крови в мозг и в обратном направлении, предохраняя центральную нервную систему (ЦНС) от попадания токсинов, вирусов и бактерий [1]. Однако эти защитные механизмы ограничивают прохождение многих лекарств в мозг. Известно, что среди 7 тыс. существующих препаратов только 5% применяются для лечения заболеваний ЦНС [2]. В связи с этим поиск методов преодоления ГЭБ представляет собой актуальную задачу для медицины.

Фотодинамическое воздействие (ФЗ) представляет собой комбинированное влияние лазера



и фотосенсибилизатора (порфирины, хлорины и др.) [3]. ФЗ широко применяется в клинической практике, в частности для хирургической навигации опухолей мозга [4, 5]. Связано это с тем, что фотосенсибилизатор избирательно накапливается в опухоли, и при лазерном воздействии он образует активную форму синглетного кислорода. Это сопровождается «подсветкой» опухоли в ультрафиолетовых лучах, что дает возможность хирургу видеть границы опухоли. Кроме того, синглетный кислород оказывает цитотоксическое действие, повреждая сосуды опухоли и вызывая апоптоз [6, 7].

Недавно в исследованиях было показано, что ФЗ может временно увеличивать проницаемость ГЭБ. Хиршберг с соавт., используя стереотаксическую установку и ФЗ (635 нм) у здоровых крыс, зарегистрировали увеличение проницаемости ГЭБ к низкомолекулярному гадолинию [8]. Мэдсен с соавт. применяли лазерное воздействие (670 нм) через интактный череп с фотосенсибилизатором алюминиевым фталоцианином ($AlPcS_{2a}$) для транспортировки макрофагов через ГЭБ [9].

Однако в указанных работах применялись высокие дозы ФЗ и не изучались последствия ФЗ на ткани и сосуды мозга. Для оптимизации ФЗ применения в отношении проницаемости ГЭБ была поставлена задача изучить дозозависимые эффекты ФЗ, включая разные дозы лазера и фотосенсибилизатора, на состояние сосудов и тканей мозга.

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на белых мышцах весом 20 г ($n = 70$) в следующих группах: 1) интактные, без ФЗ (контрольная группа); после ФЗ (Дж/см²): 2) 10; 3) 15; 4) 20; 5) 40 соответственно.

Все процедуры были выполнены в соответствии с протоколом, одобренным Комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 07.02.2018).

Фотодинамическое воздействие проводили под общей газовой анестезией (2% изофлуран, 1л/мин $N_2O/O_2 - 70:30$) с применением лазера (635 нм, XPeBRD L1 0000 00901, CREE, Inc. США, Дарем) и фотосенсибилизатора 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛА, 20 мг/кг, iv). В одной группе с ФЗ (15 Дж/см²) применяли фотосенсибилизатор 5-АЛА в высокой дозе 80 мг/кг (iv). Через 30 мин после инъекции мышей фиксировали на стереотаксической установке и с помощью хирургической дрели (Mikroton, Aescular, Турция, Стамбул) открывали черепную коробку (2 × 2 мм). После

чего на открытую область мозга воздействовали лазером с различными дозами излучения. Эффект от лазерного воздействия на ткани мозга контролировали термпарой (Pico USB TC-08, Великобритания, Сейнт Неотс). Температура не превышала 2–3°C от уровня температуры кожи мыши (28°C) для самой высокой дозы облучения.

Для оценки проницаемости ГЭБ к высокомолекулярным соединениям, таким как *Evans Blue* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI, USA), применяли спектрофлуориметрический метод. Краситель *Evans Blue* (2 мг/25 мг мыши, 1%-й раствор) вводили в правую бедренную вену. Через 30 мин циркуляции красителя мышей декапитуировали и извлекали мозг, который немедленно помещали на лед. Анализ концентрации *Evans Blue* был выполнен в группах 1 – 5, $n = 7$ для каждой группы.

Конфокальная микроскопия применялась как дополнительный метод для оценки проницаемости ГЭБ [10]. Для этого использовали внутривенное введение FITC-декстрана 70 кДа (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI, USA 4 мг/25 г, 0.5% раствор). FITC-декстран циркулировал в крови в течение 2 мин, после чего мышей декапитуировали, мозг немедленно извлекали и помещали для фиксации в 4% параформальдегид на сутки. Срезы мозга (50 мкм) получали на вибротоме (Leica Микросистема 1000-X VT, Германия). Делали 8–12 срезов с одного мозга для анализа на конфокальном микроскопе (Olympus FV10i-W, Олимп, Япония) в группах 1 – 5, $n = 7$ для каждой группы. Для качественной оценки проницаемости ГЭБ использовали маркер на астроциты ГЭБ глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP).

Гистологический метод применяли для оценки состояния тканей мозга и сосудов. Для окрашивания срезов мозговой ткани применялись гистологические красители: гематоксилин и эозин. Толщина срезов не превышала 4–5 мкм. Образцы оценивали с помощью световой микроскопии с использованием микроскопа Mikrovizor medical mVizo-103 (ЛОМО, Россия).

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Различия в одной группе были оценены программой Wilcoxon test. Межгрупповые различия оценивались с использованием программ Mann-Whitney test и ANOVA-2. Различия считались достоверными при критерии $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований оценивали проницаемость ГЭБ к белковому комплексу *Evans Blue*.



Результаты представлены в таблице. Были установлены дозозависимые изменения в ГЭБ через 1 ч после ФЗ. Минимальная доза ФЗ 10 Дж/см² вызывала повышение проницаемости ГЭБ к *Evans Blue* в 20,6 раз ($p < 0.001$); 15 Дж/см² – в 46,75 раз ($p < 0.001$); 20 Дж/см² – в 46,04 раз ($p < 0.001$); 30 Дж/см² – в 46,07 раз ($p < 0.001$).

Эффект фотодинамического воздействия на проницаемость ГЭБ для альбуминового комплекса *Evans Blue* ($n = 7$)

Доза лазера, Дж/см ² , мВт, с	Концентрация <i>Evans Blue</i> в мозге, мг/г ткани
До облучения (контрольная группа)	0.41±0.04
90 мин после ФЗ	
10 ; 40 ; 250	8.45±0.05***
15 ; 40 ; 375	19.17±0.07***
20 ; 60 ; 333	18.88±0.06***
40 ; 100 ; 400	18.89±0.09***
4 ч после ФЗ	
10 ; 40 ; 250	0.52±0.05
15 ; 40 ; 375	0.57±0.03
20 ; 60 ; 333	0.49±0.03
40 ; 100 ; 400	0.57±0.04

Примечание. $p < 0,001$; *** – относительно контроля (до ФЗ).

Как видно из представленных результатов, малые дозы ФЗ (10–15 Дж/см²) повышали проницаемость ГЭБ в дозозависимой прогрессии.

Лазерное облучение 15 Дж/см² сопровождалось в 2 раза ($p < 0.001$) более выраженным увеличением концентрации *Evans Blue* в тканях мозга, чем лазерное облучение с дозой 10 Дж/см². Однако дальнейшее повышение интенсивности ФЗ (20–40 Дж/см²) не приводило к более значительному открытию ГЭБ, т.е. уровень *Evans Blue* в тканях мозга соответствовал такому при ФЗ с дозой облучения 15 Дж/см².

Важно обратить внимание, что не было отмечено изменений в проницаемости ГЭБ в контрольной группе (до ФЗ) при облучении только одним лазером или при введении только 5-АЛА.

По данным гистологического анализа было установлено, что ФЗ на проницаемость ГЭБ сопровождалось во всех случаях развитием вазогенного отека (эдемы), т.е. накоплением избыточной жидкости в периваскулярном пространстве (рис. 1). Применение доз облучения 10 и 15 Дж/см² вызывало развитие умеренной эдемы, в то время как дозы ФЗ 20 и 30 Дж/см² приводили к появлению выраженного отека вокруг сосудов мозга. Восстановление тканей мозга наблюдалось через 3 дня после ФЗ (10 и 15 Дж/см²) и через 14 дней после ФЗ (20 и 30 Дж/см²).

Поскольку доза лазера 15 Дж/см² вызывала более выраженное повышение проницаемости ГЭБ на фоне тех же морфологических изменений, что и доза лазера 10 Дж/см², первая доза облучения была выбрана как оптимальная для ФЗ открытия ГЭБ.

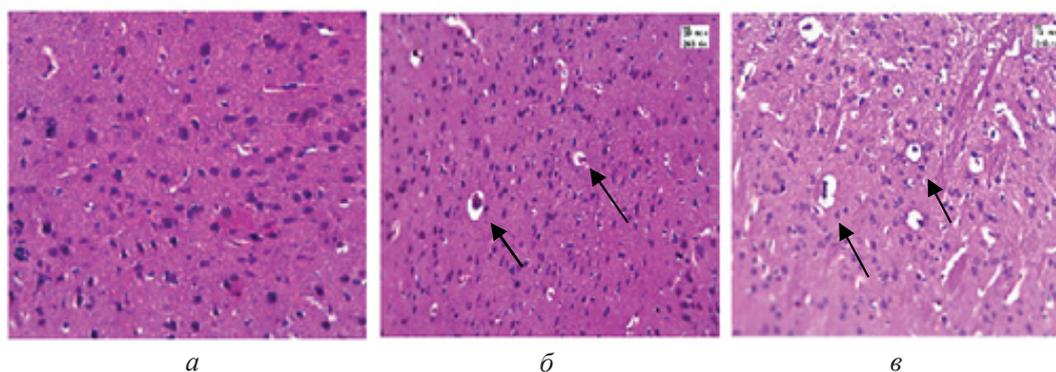


Рис. 1. Гистологическая картина изменения тканей и сосудов мозга после ФЗ повышения проницаемости ГЭБ. Стрелками показан вазогенный отек (эдема): а – до лазерного воздействия; лазерное воздействие 635 нм, 15 Дж/см² + 5-АЛА: б – 20 мг/кг; в – 80 мг/кг

На следующем этапе исследований проводили конфокальную микроскопию проницаемости ГЭБ к родаминовому декстрану 70 кДа, введенному внутривенно с применением маркера астроцитов (GFAP).

Результаты представлены на рис. 2. На верхней панели представлен контроль (до ФЗ). Как видно, декстран находится внутри сосудов, охваченных астроцитарными ножками. На нижней панели представлены данные через 90 мин

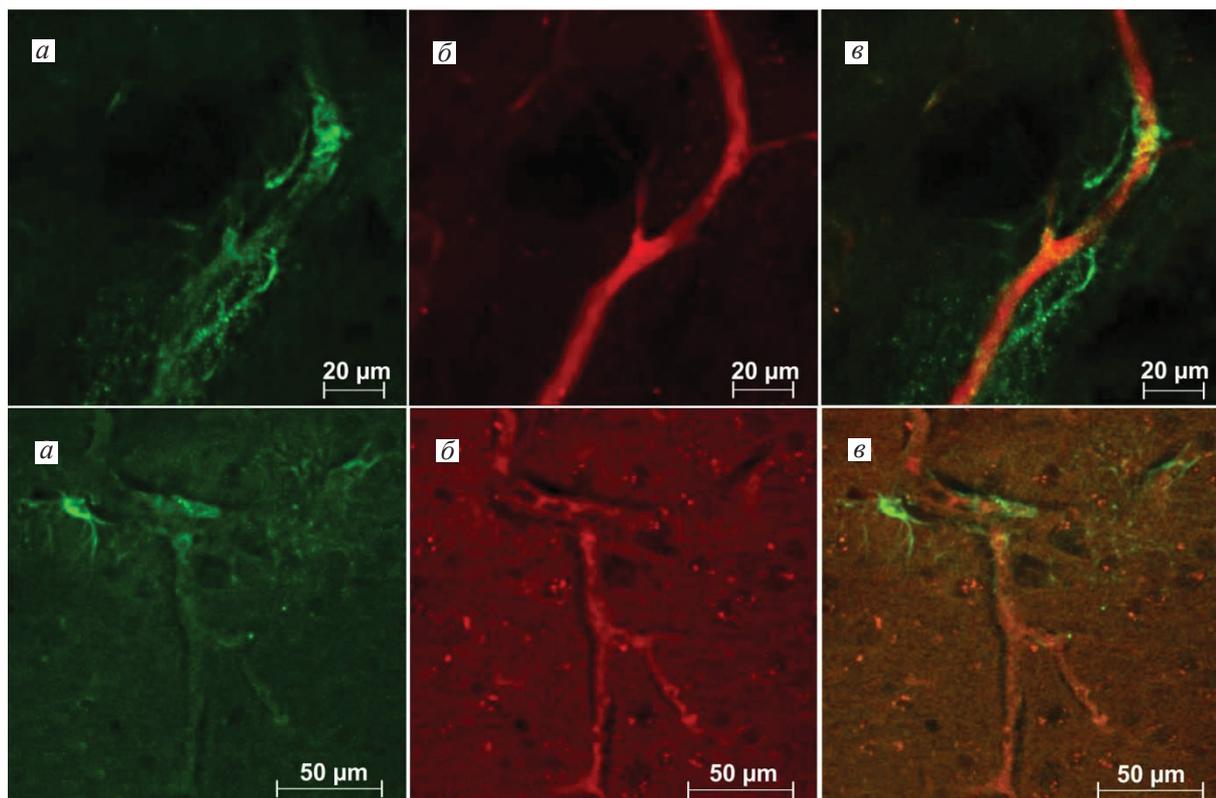


Рис. 2. Конфокальная микроскопия фотодинамического открытия ГЭБ для родаминового декстрана 70 кДа (красный цвет) с применением маркера астроцитов GFAP (зеленый цвет) в контроле (верхние снимки) и после ФЗ (нижние снимки): *a* – изображение астроцитов; *б* – декстран внутри сосудов и в паренхиме мозга (указано стрелками); *в* – совмещенная фотография *a* и *б*. Примерно 10–12 срезов анализировались с одного мозга

после ФЗ. Декстран обнаруживался между сосудами мозга и астроцитами, что свидетельствует об открытии ГЭБ и его высокой проницаемости к декстрану [10].

Таким образом, результаты показали эффективность фотодинамического повышения проницаемости ГЭБ в малых дозах лазерного облучения.

В ходе работы была показана оптимизация фотодинамических эффектов на проницаемость сосудов головного мозга. Была выявлена оптимальная доза ФЗ (635 нм, 15 Дж/см², 5-АЛА-20 мг/кг, *i.v.*) для проницаемости ГЭБ, в то время как в работах Хиршберга и Мэдсона [8, 9] в данной области дозы ФЗ не являются безопасными и не применимы в медицине.

Механизмы, лежащие в основе установленного ФЗ на открытие ГЭБ, мало изучены, но есть доказательства, что вызванный ФЗ синглетный кислород (¹O₂) оказывает негативный эффект на регулирование сосудистого тонуса эндотелиальных клеток, сокращает приток и выход кальция из внутриклеточных запасов [11, 12], тем самым

запасы кальция истощаются в клетках и наступает ключевой момент в механизмах, лежащих в основе прямого влияния ¹O₂ во время сужения и расширения сосудов.

Заключение

В результате работы была показана оптимальная доза ФЗ (635 нм, 15 Дж/см², 5-АЛА-20 мг/кг, *i.v.*) и его эффект на проницаемость сосудов головного мозга у здоровых мышей. При этих дозировках отмечается обратимое открытие ГЭБ с восстановлением мозговых тканей. Однако увеличение концентрации фотосенсибилизатора 5-АЛА вызывает повреждение мозговых тканей. Полученные результаты являются важной информативной платформой для получения принципиально новых знаний о фотомеханических эффектах на ткани и сосуды мозга.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Проектная часть. Государственное задание № 17.1223.2017/ПЧ).



Список литературы

1. *Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., Yusof S. R., Begley D. J.* Structure and function of the blood-brain barrier // *J. Neurobiol Dis.* 2010. Vol. 37, № 1. P. 13–25.
2. *Pardridge W. M.* Blood-brain barrier delivery // *Journal Drug Discov. Today.* 2007. Vol. 12, № 1–2. P. 54–61.
3. *Mizutani T. A., Murayama Y., Ikoma H., Arita T., Kosuga T., Konishi H., Morimura R., Shiozaki A., Kuriu Y., Nakanishi M., Fujiwara H., Okamoto K., Otsuji E.* Useful Case of Photodynamic Diagnosis of Inferior Vena Cava Invasion by Pancreatic Head Cancer Using 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) // *Gan to Kagaku Ryoho.* 2018. Vol. 45, № 3. P. 575–577.
4. *Stummer W., Stepp H., Wiestler O. D., Pichlmeier U.* Randomized, Prospective Double-Blinded Study Comparing 3 Different Doses of 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Resection of Malignant Gliomas // *Neurosurgery.* 2017. Vol. 81, № 2. P. 230–239.
5. *Kuroiwa T.* Photodynamic diagnosis and photodynamic therapy for the brain tumors // *Progress in Neuro-Oncology.* 2014. Vol. 21, № 3. P. 14–21.
6. *Krammer B.* Vascular effects of photodynamic therapy // *Anticancer Res.* 2001. Vol. 21, № 6B. P. 4271–4277.
7. *Stylli S. S., Kaye A. H.* Photodynamic therapy of cerebral glioma-A review Part I-A biological basis // *J. Clin. Neurosci.* 2006. Vol. 13, № 6. P. 615–625.
8. *Hirschberg H., Uzal F. A., Chighvinadze D., Zhang M. J., Peng Q., Madsen S. J.* Disruption of the Blood-Brain Barrier Following ALA-Mediated Photodynamic Therapy // *Lasers Surg. Med.* 2008. Vol. 40, № 8. P. 535–542.
9. *Madsen, S. J., Gach H. M., Hong S. J., Uzal F. A., Peng Q., Hirschberg H.* Increased nanoparticle-loaded exogenous macrophage migration into the brain following PDT-induced blood-brain barrier disruption // *Lasers Surg. Med.* 2013. Vol. 45, № 8. P. 524–532.
10. *Hoffmann A., Bredno J., Wendland M., Derugin N., Ohara P., Wintermark M.* High and low molecular weight fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran to assess blood-brain barrier disruption : technical consideration // *Transl. Stroke Res.* 2011. Vol. 2, № 1. P. 106–111.
11. *Semyachkina-Glushkovskaya O., Abdurashitov A., Pavlov A., Shirokov A., Navolokin N., Pavlova O., Gekalyuk A., Ulanova M., Shushunova N., Bodrova A., Saranceva E., Khorovodov A., Agranovich I., Fedorova V., Sagatova M., Shareef A. E., Zhang C., Zhu D., Tuchin V.* Laser speckle imaging and wavelet analysis of cerebral blood flow associated with the opening of the blood-brain barrier by sound // *Chin. Opt. Lett.* 2017. Vol. 15, № 9. P. 090002.
12. *Angell-Petersen E., Spetalen S., Madsen S. J., Sun C. H., Peng Q., Carper S. W., Sioud M., Hirschberg H.* Influence of light fluence rate on the effects of photodynamic therapy in an orthotopic rat glioma model // *J. Neurosurg.* 2006. Vol. 104, № 1. P. 109–117.

Optimization of Photodynamic Effects on Permeability of Cerebral Vessels

O. V. Semyachkina-Glushkovskaya, A. A. Shirokov, N. A. Navolokin, A. V. Terskov, A. A. Bodrova, N. A. Shushunova, A. P. Khorovodov, M. V. Ulanova, I. M. Agranovich, T. D. Iskra, A. T. Mamedova

Oksana V. Semyachkina-Glushkovskaya, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

Aleksandr A. Shirokov, <https://orcid.org/0000-0003-3239-7877>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPFM RAS), 13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049, Russia, shirokov_a@ibppm.ru

Nikita A. Navolokin, <https://orcid.org/0000-0001-7876-9758>, Saratov State Medical University, 112, Bolshaya Kazachya Str., Saratov, 410010, Russia, nik-navolokin@yandex.ru

Andrey V. Terskov, <https://orcid.org/0000-0003-1111-9990> Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, terskov.andrey@gmail.com

Anastasiya A. Bodrova, <https://orcid.org/0000-0002-0300-7481>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, nastya1535@mail.ru

Natalia A. Shushunova, <https://orcid.org/0000-0001-5366-1783>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, shushunovan.a@gmail.com

Aleksandr P. Khorovodov, <https://orcid.org/0000-0002-5318-5200>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, khorovodov2012@yandex.ru

Maria V. Ulanova, <https://orcid.org/0000-0002-6516-1687>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, maru-ulanova@mail.ru

Ilana M. Agranovich, <https://orcid.org/0000-0002-7903-3897>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilana.agranovich@yandex.ru

Tatyana D. Iskra, <https://orcid.org/0000-0002-1895-8159>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, tata-isk@yandex.ru

Aysel T. Mamedova, <https://orcid.org/0000-0002-0229-0801>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, mamedovaysel95@gmail.com



Photodynamic treatment (PDT) causes a significant increase in the permeability of the blood-brain barrier (BBB) in healthy mice. Using different doses of laser radiation (635 nm, 10–40 J/cm²) and photosensitizer (5-aminolevulinic acid – 5-ALA, i.v.), we found the optimal PDT for the reversible opening of the BBB, exhibiting brain tissue recovery 3 days after PDT. Further increases in the laser radiation or 5-ALA doses have no amplifying effect on the BBB permeability, but are associated with severe damage of brain tissues. These results can be an informative platform for further studies of new strategies in brain

drug delivery and for better understanding of mechanisms underlying cerebrovascular effects of PDT-related resection of brain tumor.

Key words: photodynamic treatment, blood-brain barrier, lasers, endothelial permeability.

Acknowledgements: *This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project Part., State Task no. 17.1223.2017 / FH).*

Образец для цитирования:

Семьячкина-Глушковская О. В., Широков А. А., Наволокин Н. А., Терсков А. В., Бодрова А. А., Шушунова Н. А., Хороводов А. П., Уланова М. В., Агранович И. М., Искра Т. Д., Мамедова А. Т. Оптимизация фотодинамических эффектов на проницаемость сосудов головного мозга // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 423–428. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-423-428>

Cite this article as:

Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Shirokov A. A., Navolokin N. A., Terskov A. V., Bodrova A. A., Shushunova N. A., Khorovodov A. P., Ulanova M. V., Agranovich I. M., Iskra T. D., Mamedova A. T. Optimization of Photodynamic Effects on Permeability of Cerebral Vessels. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 423–428 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-423-428>



УДК 595.726:591.5

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОЛОГИИ ПРЯМОКРЫЛЫХ (INSECTA: ORTHOPTERA) В УСЛОВИЯХ ВОЛЖСКО-КАМСКОГО ПРИРОДНОГО БИОСФЕРНОГО ЗАПОВЕДНИКА



И. О. Кармазина, Н. В. Шулаев

Кармазина Инесса Олеговна, аспирант кафедры зоологии и общей биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, acrida2008@gmail.com

Шулаев Николай Вячеславович, кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и общей биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, shulaev@bk.ru

Приводятся данные по изучению сезонной динамики прямокрылых насекомых (Orthoptera). Исследования, сбор материала и наблюдения проводились в различных биотопах на территории Волжско-Камского государственного природного биосферного заповедника. Выявлены фенологические особенности 26 фоновых видов из семейств кузнечиковых, тетриков и саранчовых. Виды распределены по пяти фенологическим группам: весенне-летняя, раннелетняя, летняя, летне-позднелетняя и позднелетняя. Наибольшее число видов относится к летне-позднелетней группе. Наибольшее видовое разнообразие наблюдается с середины июля до конца августа. Также полученные результаты позволили нам выделить пять сезонных аспектов: поздневесенний, раннелетний, летний, позднелетний и осенний. Приводятся сроки сменяющихся друг друга сезонных аспектов. В результате наблюдений установлено, что в различных биотопах развитие идет неодновременно, причем это отставание может растянуться на одну декаду. На некоторых биотопах некоторые сезонные аспекты не прослеживаются вовсе, как например ранневесенний аспект. Полученные результаты сравнивались с результатами подобных исследований, проведенных в соседней с Республикой Татарстан Кировской областью. В целом сроки развития различаются незначительно. В Кировской области развитие некоторых фенологических группы идет с небольшой задержкой.

Ключевые слова: прямокрылые насекомые, фенологическая группа, сезонный аспект, Волжско-Камский заповедник.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-429-432>

Прямокрылые – отряд насекомых с неполным превращением, представители которого имеют большое практическое значение как вредители сельскохозяйственных растений. Для правильной организации и успешного проведения мероприятий по прогнозированию и борьбе с ними необходимо знать особенности их жизненного цикла [1]. Изучение сезонной динамики сообществ и фенологии отдельных видов позволяет более полно понять их экологические особенности.

Видовой состав прямокрылых Волжско-Камского заповедника изучен довольно хорошо [2], однако отсутствовали данные по их фенологии. Исследования проводились в течение вегетационных сезонов 2007–2014 гг. с конца апреля до конца октября, с периодичностью раз в декаду.

Нами фиксировались важнейшие моменты развития фоновых видов прямокрылых в различных биотопах заповедника. В III декаде апреля и II декаде мая для определения фенодат отрождения личинок прямокрылых учеты проводились чаще, с интервалом в 4–6 дней. При этом учитывались сроки отрождения (единично, массово), личиночный возраст, сроки появления имаго (единичные экземпляры и массово), отмечалась доля половозрелых особей и дата последней встречи имаго.

Проведенные наблюдения позволили выявить фенологические особенности 26 фоновых видов прямокрылых на территории заповедника. Все виды отнесены нами к пяти фенологическим группам (таблица).

Весенне-осенняя группа – диапауза на стадии личинки и имаго. Характерны виды рода *Tetrix*, которые появляются ранней весной (III декада апреля – I декада мая) и активны на протяжении всего вегетационного периода.

Раннелетняя группа – к ней отнесены такие виды, как *Ch. dispar*, *E. brachyptera*, *O. viridulus*. Отрождение личинок происходит в III декаде мая, имаго появляются ко II декаде июня. При этом *O. viridulus* перестает встречаться к концу июля, два других вида единично встречаются в середине августа до середины сентября.

Летняя группа – к данной группе принадлежит 4 вида: *D. verrucivorus*, *C. discolor*, *G. brunneus*, *Ch. albomarginatus*. Отрождение личинок в III декаде мая – I декаде июня, окрыление – в III декаде июня – I декаде июля. Большая часть из них активны до середины сентября;

Летне-позднелетняя группа – к ней отнесены 10 видов: *T. cantans*, *T. caudata*, *Ph. griseoptera*, *B. bicolor*, *B. rosellii*, *Ch. parallelus*, *Ch. dorsatus*, *Ch. apricarius*, *Ph. falcata*. Отрождение личинок и окрыление в сроки видов летней группы, но активность популяции частично растягивается до глубокой осени.

Позднелетняя группа – включает 6 видов: *G. rufus*, *D. brevicollis*, *S. grossum*, *E. pulverulentus*, *P. stridulus*, *Oe. coerulescens*. Личинки появляются к середине июля, у некоторых видов нимфы встречаются до третьей декады сентября, имаго – со II декады августа. Активны до заморозков и установления постоянного снежного покрова.



Фенология фоновых видов прямокрылых на территории Волжско-Камского заповедника

№	Вид**	Месяц, декада																				
		Апрель			Май			Июнь			Июль			Август			Сентябрь			Октябрь		
		III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III		
1. Весенне-осенние виды																						
1	<i>Tetrix bipunctata</i> (Linnaeus, 1758)	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±			
2	<i>T. subulata</i> (Linnaeus, 1761)	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±			
3	<i>T. tenuicornis</i> (Sahlberg, 1891)	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±			
2. Раннелетние виды																						
4	<i>Chrysochraon dispar</i> (Germar, 1836)			-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	*	*							
5	<i>Euthystira brahyptera</i> (Ocskay, 1826)			-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	*							
6	<i>Omocestus viridulus</i> (Linnaeus, 1758)			-	-	±	+	+	+	+	+	*										
3. Летние виды																						
7	<i>Conocephalus discolor</i> Thunberg, 1815				-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	*						
8	<i>Decticus verrucivorus</i> (Linnaeus, 1758)					-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	*						
9	<i>Chorthippus albomarginatus</i> (De Geer, 1773)				-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	*						
10	<i>Glyptobothrus brunneus</i> (Linnaeus, 1758)				-	-	-	±	+	+	+	+	+	+								
4. Летне-позднелетние виды																						
11	<i>Tettigonia cantans</i> (Fuessly, 1775)			-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*			
12	<i>Tettigonia caudate</i> (Charpentier, 1842)				-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	*						
13	<i>Pholidoptera griseoptera</i> (De Geer, 1773)			-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	*	*				
14	<i>Phaneroptera falcata</i> (Poda, 1761)				-	-	-	-	±	±	+	+	+	+								
15	<i>Bicolorana bicolor</i> (Philippi, 1830)				-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*				
16	<i>B. roeselii</i> (Hagenbach, 1822)			-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	*					
17	<i>Chorthippus apricarius</i> (Linnaeus, 1758)					-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	*					
18	<i>Ch. dorsatus</i> (Zetterstedt, 1921)				-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+	*						
19	<i>Ch. parallelus</i> (Zetterstedt, 1921)			-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	*	*					
20	<i>Glyptobothrus biguttulus</i> (Linnaeus, 1758)			-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*					



На остепненном склоне опушки сосняка почти не выражен ранневесенний аспект и наблюдается сокращение раннелетнего аспекта. Лучше всего на склонах юго-западной экспозиции выражен летний аспект. И, наоборот, на разнотравно-злаковом лугу, более увлажненном, раннелетний аспект выражен более четко. Это связано с тем, что влажные условия обитания благоприятствуют более долгому сохранению здесь раннелетних видов [6].

Таким образом, нами выявлено пять последовательных сезонных аспектов у прямокрылых Волжско-Камского заповедника: поздневесенний, раннелетний, летний, позднелетний и осенний. Смена этих аспектов в сообществах прямокрылых, заселяющих различные станции, идет неравномерно.

Сравнивая полученные нами данные с результатами подобных исследований, проведенных и В. А. Копысовым [1] для Кировской области, отметим, что сроки отрождения личинок различаются слабо. Нужно отметить, что для многих типичных видов прямокрылых Татарстана сроки отдельных фаз жизненного цикла опережают таковые в сравнении с Кировской областью, при этом различия незначительные (обычно в пределах декады).

Список литературы

1. Копысов В. А. К фенологии прямокрылых окрестностей г. Кирова // Учен. зап. Естеств.-геогр. фак., кафедра зоологии. Киров, 1970. Вып. 31. С. 78–83.
2. Кармазина И. О., Шулаев Н. В. Фауна и экология прямокрылых насекомых (Insecta : Orthoptera) Волжско-Камского государственного природного биосферного заповедника // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2009. Т. 151 (2). С. 173–180.
3. Лачининский А. В., Сергеев М. Г., Чильдебаев М. К., Черняховский М. Е., Локвуд Дж. А., Камбулин В. Е., Гаппаров Ф. А. Саранчовые Казахстана, Средней Азии и сопредельных территорий. Ларами : Междунар. ассоциация прикладной акридологии и Ун-т Вайоминга, 2002. 387 с.
4. Стороженко С. Ю. Длинноусые прямокрылые насекомые (Orthoptera : Enliferia) Азиатской части России. Владивосток : Дальнаука, 2004. 280 с.

Образец для цитирования:

Кармазина И. О., Шулаев Н. В. Особенности фенологии прямокрылых (Insecta: Orthoptera) в условиях Волжско-Камского природного биосферного заповедника // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 429–432. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-429-432>

Cite this article as:

Karmazina I. O., Shulaev N. V. Phenological Characteristics of Orthopterous Insects (Orthoptera) in the Volga-Kama State Nature Biosphere Reserve. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 429–432 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-429-432>

5. Быкасова В. М. Фенология видов и сезонные аспекты в смешанной популяции саранчовых на Алтае // Фауна и экология животных : сб. ст. / под ред. С. П. Наумова. М. : МГПИ им. В. И. Ленина, 1972. С. 33–37.
6. Скалон О. Н., Скалон Н. В., Шереметова С. А. Фенология и сезонные аспекты прямокрылых насекомых (Orthoptera) в луговых сообществах Кузнецкой котловины // Тр. Рус. энтомол. о-ва. 2008. Т. 78, № 2. С. 81–87.

Phenological Characteristics of Orthopterous Insects (Orthoptera) in the Volga-Kama State Nature Biosphere Reserve

I. O. Karmazina, N. V. Shulaev

Inessa O. Karmazina, <https://orcid.org/0000-0002-3650-3334>, Kazan Federal University, 18, Kremlevskaya Str., Kazan, 420012, Russia, acrida2008@gmail.com

Nikolay V. Shulaev, <https://orcid.org/0000-0002-8750-4417>, Kazan Federal University, 18, Kremlevskaya Str., Kazan, 420012, Russia, shulaev@bk.ru

In this brief communication, the results of the research on the seasonal dynamics of orthopterous insects (Orthoptera) are discussed. The research was performed in the Volga-Kama State Nature Biosphere Reserve. Field sampling and observations were carried out for different biotopes of the nature reserve. The phenological characteristics of 26 background species of the families Tettigoniidae, Tetrigidae, and Acridoidea were revealed. The species under study were divided into five phenological groups: spring-summer, early summer, summer summer-late summer, and late summer. Most species belonged to the summer-late summer group. The highest species diversity was observed from the middle of July to the end of August. Furthermore, five seasonal aspects influencing the population dynamics were singled out based on the obtained results: late spring, early summer, summer, late summer, and autumn. The periods of all the successive aspects were identified. It was discovered that development proceeds non-uniformly for different biotopes. The delay may be up to one decade. For some biotopes, the seasonal aspects, such as the early-spring one, were not observed at all. The results were compared with the data from similar studies performed in Kirov oblast neighboring the Republic of Tatarstan. In general, the development periods differed insignificantly. In Kirov oblast, a slight delay occurs in the development of some phenological groups.

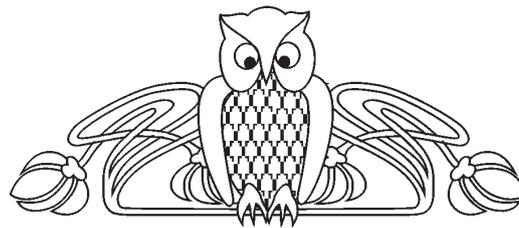
Key words: orthopterous insects, phenological group, seasonal aspect, Volga-Kama State Nature Biosphere Reserve.



УДК 612.42

РОЛЬ МЕНИНГИАЛЬНОЙ ЛИМФАТИКИ В ПРОЦЕССАХ ОЧИЩЕНИЯ МОЗГА: ВИЗУАЛИЗАЦИЯ *IN VIVO*

Э. Н. Дуарте Торрес, А. С. Абдурашитов, А. А. Намыкин,
А. А. Широков, Н. А. Шушунова, Е. И. Саранцева,
О. В. Семячкина-Глушковская



Дуарте Торрес Эрик Николас, студент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, inkvision10@gmail.com

Абдурашитов Аркадий Сергеевич, аспирант кафедры оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Учебная лаборатория атомной физики, квантовой электроники и спектроскопии, abdurashitov-optics@mail.ru

Намыкин Антон Александрович, аспирант кафедры оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Учебная лаборатория атомной физики, квантовой электроники и спектроскопии, anton-namikin@bk.ru

Широков Александр Александрович, кандидат химических наук, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shirokov_a@ibppm.ru

Шушунова Наталия Александровна, магистрант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, shushunovan.a@gmail.com

Саранцева Елена Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, sorphora68@mail.ru

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, заведующая кафедрой физиологии человека и животных, доцент, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, glushkovskaya@mail.ru

В экспериментах на крысах было проведено введение в паренхиму мозга красителя *Evans Blue* и золотых наностержней с последующей их визуализацией с помощью оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии. Результаты показали, что менингеальная лимфатика играет важную роль в очистке головного мозга от применяемых маркеров, введенных в его ткани. Мозг быстро очищается от красителя по менингеальному лимфатическому пути. В свете открытия лимфатических сосудов в оболочках мозга становится очевидно, что менингеальная лим-

фатика является связующим звеном между выведением спинномозговой и интерстициальной жидкостей из мозга в периферическую лимфатику. Именно глубокий шейный лимфатический узел определяется как первое звено в этой цепочке. Показано, что глубокий шейный лимфатический узел является первой анатомической «станцией» на пути оттока жидкости из мозга. Для понимания этих процессов впервые были разработаны специальные подходы для визуализации прозрачных лимфатических сосудов в оболочках мозга с применением оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии. Полученные данные показывают, что лимфатические механизмы лежат в основе дренажной и очистительной функций мозга.

Ключевые слова: менингеальная лимфатическая система, оптическая когерентная томография, флуоресцентная микроскопия, *Evans blue*, золотые наностержни.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-433-438>

Введение

Более двух тысячелетий в нейрофизиологии считалось, что лимфатические сосуды в мозге отсутствуют. Несмотря на опыты итальянского анатома Паоло Маскагни [1, 2], который еще в XVIII в. представил макеты сплетения прозрачных сосудов в оболочках мозга и назвал их лимфатическими, вплоть до недавнего времени господствовало представление об «иммунной стерильности» мозга.

Благодаря прогрессу в оптической визуализации стало возможным повторить опыты Маскагни с применением современных технологий конфокальной и двухфотонной микроскопии. В 2015 г. были опубликованы результаты двух независимых научных групп, которые доказали существование лимфатических сосудов в оболочках мозга [3, 4]. В связи с этим появились новые пути изучения неизвестных процессов, таких как движение лимфоцитов из головного мозга и связь центральной и периферической лимфатических систем.

Существует гипотеза о том, что менингеальная лимфатика вовлечена в механизмы, ответственные за очищение мозга от метаболитов [5, 6]. Эти механизмы являются частью недавно обнаруженной лимфатической системы, которая осуществляет движение жидкости из крове-



носных сосудов в ткани мозга и далее снова в кровотоки. Однако механизмы работы лимфатической системы подвергаются сомнению в силу отсутствия доказательств возможности движения жидкости через глию и, в частности, через астроциты, как утверждают создатели теории о лимфатической системе [5, 6]. Данная теория построена на опытах по введению флуоресцентных маркеров в цистерны magna, после чего наблюдается их быстрое (за 5 мин) распространение в паренхиме головного мозга. Однако это утверждение не имеет ясных свидетельств. Сейчас активно обсуждается, что такое быстрое распространение краски по мозгу возможно только через пространства Вирхова–Робина [7–9], но не через астроциты, для чего пока еще не было представлено физиологических обоснований.

Существование менингеальной лимфатики открывает горизонты в появлении принципиально новых фундаментальных знаний о процессах очищения мозга от метаболитов и соединений, которые попадают в него через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Известно, что ГЭБ строго контролирует процесс поступления веществ в ткани мозга, и нарушение его барьерной функции приводит к серьезным последствиям в его работе [10–13]. Очевидно, что мозг обладает процессами защиты, связанными с экстренным очищением его тканей в условиях открытия ГЭБ. Однако эти процессы остаются неизвестными.

Для понимания этих процессов нами впервые были разработаны специальные подходы для визуализации прозрачных лимфатических сосудов в оболочках мозга с применением оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии. На основе этих технологий были поставлены задачи: изучить роль менингеальной лимфатики в процессах очищения мозга от красителя *Evans Blue* и золотых наностержней, введенных в его паренхиму.

Материалы и методы

Объекты исследования

Во всех экспериментах использовали самцов крыс. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях с доступом к пище и воде *ad libitum*. Протокол эксперимента был одобрен комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 07.02.2018).

Изготовление золотых наностержней

Исходная суспензия золотых наночастиц была приготовлена в бинарной смеси поверхностного активного вещества [14, 15]. При анализе изображений просвечивающей электрон-

ной микроскопии средняя ширина наночастиц составляла 16 ± 3 нм, а толщина 92 ± 17 нм. Эти данные хорошо согласуются с положениями продольного (975 нм) и поперечного (507 нм) резонансов в спектре экстинкции. Электронно-микроскопический и спектрофотометрический анализы проводили на базе ЦКП «СИМБИОЗ» ИБФРМ РАН (Саратов).

Введение в ткани мозга *Evans Blue* и золотых наностержней

Evans Blue (17 мкл, Sigma, США, 1% раствор) и золотые наностержни (17 мкл) вводили в паренхиму мозга (2 мм латеральнее и 2,5 мм каудальнее от брегмы) под общей газовой анестезией (2% изофлуран, 1 л/мин $N_2O/O_2 - 70:30$). Введение осуществляли на глубину 2 мм с помощью иглы 34-G Hamilton со скоростью 0,1 мкл/мин (Harvard Apparatus, США).

Оптическая когерентная томография (ОКТ)

Система (Thorlabs Ganymede II 930 нм) была использована для визуализации накопления золотых наностержней в полости глубокого шейного лимфатического узла. Скорость сканирования была равна 30 кГц. Осевые и боковые размеры поля обзора (FOV) составляли 3 и 2 мм соответственно (1,8 и 2,9 мкм в записанных изображениях). Регистрировали через 5 минут после инъекции раствора наностержней.

Флуоресцентная микроскопия

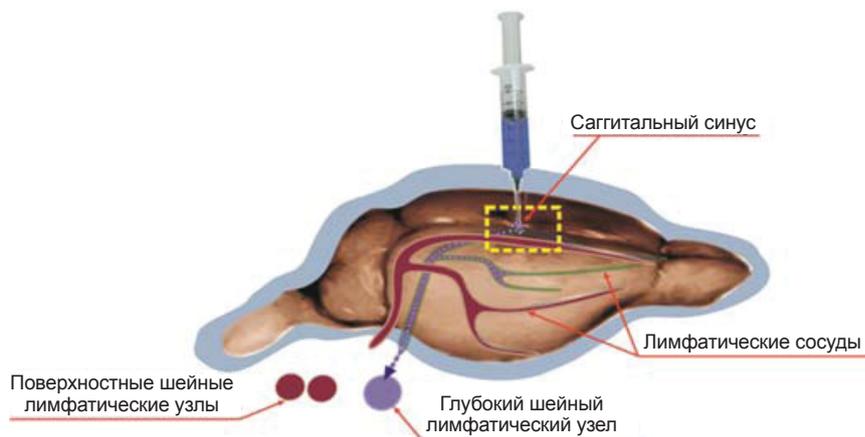
Флуоресцентный микроскоп использовался для изображения лимфатических сосудов после инъекции *Evans Blue* в мозг [16]. Самодельная установка состоит из объектива микроскопа с увеличением 5,5 и числовой апертурой 0,12 и камеры CMOS (DCC1545M, Thorlabs Inc, США).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований изучали процесс выведения краски *Evans Blue* из тканей мозга путем визуализации накопления красителя в лимфатических узлах (рисунок).

Краситель *Evans Blue* вводили непосредственно в паренхиму мозга и с помощью бинокуляра наблюдали окраску шейных поверхностных и глубоких лимфатических узлов. Результаты показали, что через 1 ч после введения краски в ткани мозга окрашивался в синий цвет глубокий шейный поверхностный узел (см. рисунок, б). В поверхностных шейных лимфоузлах в это время наблюдения изменений не было зафиксировано.

Глубокий шейный лимфатический узел является первой анатомической станцией выхода спинномозговой жидкости из мозга, что было показано в исследованиях на животных и людях [17–19].

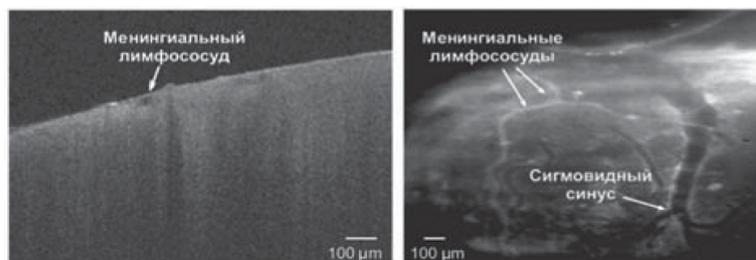


а



б

Поверхностные шейные лимфатические узлы Поверхностные шейные лимфатические узлы



в

г

Визуализация менингеальных лимфатических сосудов: а – схема эксперимента с инъекцией *Evans Blue* в паренхиму головного мозга; б – фотографии шейных лимфатических узлов до и через 1 ч после инъекции *Evans Blue* в ткани мозга (глубокий шейный лимфатический узел стал синим из-за лимфатического дренирования *Evans Blue* из мозга в полость глубокого шейного лимфатического узла. Поверхностные шейные лимфатические узлы остались неизменными; в и г – визуализация менингеальных лимфатических сосудов (указаны стрелками) вдоль венозных синусов мозга (двойные стрелки) с помощью оптической конфокальной томографии и контрастных золотых наностержней и флуоресцентной визуализации красителя *Evans Blue* в лимфатических сосудах оболочек мозга соответственно

Таким образом, наши результаты показали, что мозг быстро очищается от красителя по менингеальному лимфатическому пути. В свете открытия лимфатических сосудов в оболочках мозга и наших наблюдений становится очевидно, что менингеальная лимфатика является связующим звеном между выведением спинномозговой и интерстициальной жидкостей из мозга в периферическую лимфатику, где глубокий шейный лимфатический узел – первое звено в

этой цепочке. Наши результаты согласуются с данными других исследователей, которые также показали накопление красителя *Evans Blue* в глубоком шейном лимфатическом узле, который собирает жидкость из мозга [3, 4].

In vivo визуализация менингеальных лимфатических сосудов

In vivo визуализация менингеальной лимфатики представляет собой сложную задачу, вследствие того что лимфатические сосуды оболочек



мозга прозрачные с непостоянным током лимфы в них. Размеры этих сосудов у грызунов составляют всего 7–15 мкм в нормальном состоянии [18], что делает лимфатические сосуды «неуловимыми» для оптических приборов и существенно лимитирует исследовательские возможности.

Изучение физиологии лимфатической системы в оболочках мозга чрезвычайно актуально. Открываются новые горизонты в появлении принципиально новых знаний об иммунных процессах в тканях мозга, механизмах его очищения от токсинов и метаболитов, а также о генезе нейродегенеративных, сосудистых и онкологических заболеваний. Сегодня существует несколько методов, которые применяют в клинике для исследования периферической лимфатики. Это метод введения индоцианина зеленого [20], но он не применим в отношении лимфатики в оболочках мозга, так как нет такой аппаратуры, которая могла бы визуализировать через закрытый череп этот контрастный агент. В 2017 г. был разработан специальный алгоритм применения магнитно-резонансной томографии (МРТ, 7Т) для исследования лимфатики оболочек мозга у человека и обезьян [21]. Однако такой метод позволяет только констатировать факт наличия этих сосудов и не дает возможности изучать движение лимфы или иммунных клеток в лимфатике. Кроме того, 7Т МРТ – технологии дорогостоящие и недоступны для широкого пользования. Существует модель трансгенных грызунов с флуоресцентными лимфатическими сосудами, что позволяет изучать их прижизненно с применением двухфотонной микроскопии [4]. Однако такая модель не является коммерческой и недоступна для широкого применения в исследованиях. Таким образом, необходимо развивать технологии, позволяющие прижизненно анализировать процессы образования и движения лимфы в менингеальных лимфатических сосудах.

В данной работе были разработаны технологии применения флуоресцентной микроскопии и ОКТ для визуализации лимфатических сосудов в оболочках мозга у крыс. Для этого использовали контрастные агенты, краситель *Evans Blue* и золотые наностержни 10 нм, которые вводили в ткани мозга с целью активации процессов очищения мозга от контрастных агентов по лимфатике.

На рисунке, в изображены лимфатические сосуды (указаны стрелкой), которые заполнены красителем *Evans Blue*. Менингеальные лимфатические сосуды располагаются вдоль венозных синусов мозга (двойные стрелки), что также было показано другими исследователями в экспериментах *ex vivo* [3]. Лимфатические сосуды

заполнились красителем через 20 мин после его введения в ткани мозга, что свидетельствует о вовлечении менингеальных лимфатических сосудов в процесс очищения мозга от красителя, что было показано нами в первой серии экспериментов по визуализации глубокого шейного лимфатического узла (см. рисунок, а, б). Данные флуоресцентной микроскопии были подтверждены результатами ОКТ, где введение золотых наностержней в мозг сопровождалось появлением на ОКТ изображения сосудов с черными пустотами (заполненными наностержнями в качестве контрастного агента). Этот результат отражает факт очищения мозга от нанокompозитов после их введения в мозг по менингеальной лимфатике, что было нами также показано в опытах по изучению процессов очищения мозга от веществ, попадающих в его ткани после открытия ГЭБ [18, 19].

Заключение

В опытах на крысах проведены исследования роли менингеальной лимфатики в дренажной и очистительной функциях мозга с применением оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии. Показано, что введение в паренхиму красителя *Evans Blue* или золотых наностержней 10 нм сопровождается их быстрым выведением по менингеальным лимфатическим сосудам в периферическую лимфатику. Показана перспективность применения оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии для прижизненной визуализации лимфатической системы и дренажных процессов в мозге. Впервые выявлены принципиально важные результаты, показывающие вовлечение менингеальной лимфатики в механизмы очищения мозга от веществ, попадающих в его ткани.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-15-01263).

Благодарим доктора биологических наук Б. Н. Хлебцова (лаборатория нанобиотехнологий ИБФРМ РАН, Саратов) за синтез, оптическую характеристику и функционализацию золотых наностержней.

Список литературы

1. Mascagni P., Bellini G. B. *Istoria completa dei vasi linfatici*. Italy, Florence, 1816. Vol. 2. 195 p.
2. Lukić I. K., Glunčić V., Ivkić, G., Hubenstorf M., Marušić A. Virtual dissection : a lesson from the 18th century // *The Lancet*. 2003. Vol. 362, № 9401. P. 2110–2113.



3. Louveau A., Smirnov I., Keyes T. J., Eccles J. D., Rouhani S. J., Peske J. D., Harris T. H. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels // *Nature*. 2015. Vol. 523, № 7560. P. 337.
4. Aspelund A., Antila S., Proulx S. T., Karlsen T. V., Karman S., Detmar M., Wiig H., Alitalo K. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules // *J. of Exp. Med.* 2015. Vol. 212, № 7. P. 991–999.
5. Iloff J. J., Wang M., Liao Y., Plogg B., Peng W., Gundersen G. A., Benveniste H., Vates G. E., Deane R., Goldman S. A., Nagelhus E. A., Nedergaard M. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β // *Sci. Translat. Med.* 2012. Vol. 4, № 147. P. 147.
6. Jessen N. A., Munk A. S., Lundgaard I., Nedergaard M. The glymphatic system: a beginner's guide // *Neurochem. Res.* 2015. Vol. 40, № 12. P. 2583–2599.
7. Virchow R. Ueber die Erweiterung kleinerer Gefäße // *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin.* 1851. Vol. 3, № 3. P. 427–462.
8. Robin C. Recherches sur quelques particularites de la structure des capillaires de l'encephale // *J. Physiol. Homme. Anim.* 1859. Vol. 2. P. 537–548.
9. Nakada T. Virchow-Robin space and aquaporin-4 : new insights on an old friend // *Croatian Med. J.* 2014. Vol. 55, № 4. P. 328–336.
10. Prasad S., Sajja R. K., Naik P., Cucullo L. Diabetes mellitus and blood-brain barrier dysfunction : an overview // *J. of Pharmacovigilance.* 2014. Vol. 2, № 2. P. 125.
11. Haley M. J., Lawrence C. B. The blood–brain barrier after stroke : Structural studies and the role of transcytotic vesicles // *J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2017. Vol. 37, № 2. P. 456–470.
12. Setiadi A., Korim W. S., Elsaafien K., Yao S. The role of the blood–brain barrier in hypertension // *Exper. Physiol.* 2018. Vol. 103, № 3. P. 337–342.
13. Yamazaki Y., Kanekiyo T. Blood-brain barrier dysfunction and the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Intern. J. of Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 9. P. 1965.
14. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Ye J., Sukhorukov G. B., Khlebtsov N. G. Overgrowth of gold nanorods by using a binary surfactant mixture // *Langmuir.* 2014. Vol. 30, № 6. P. 1696–1703.
15. Ye X., Zheng C., Chen J., Gao Y., Murray C. B. Using binary surfactant mixtures to simultaneously improve the dimensional tunability and monodispersity in the seeded growth of gold nanorods // *Nano Lett.* 2013. Vol. 13, № 2. P. 765–771.
16. Lichtman J. W., Conchello J. A. Fluorescence microscopy // *Nature Methods.* 2005. Vol. 2, № 12. P. 910.
17. Cserr H. F., Harling Berg C. J., Knopf P. M. Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance // *Brain Pathology.* 1992. Vol. 2, № 4. P. 269–276.
18. Semyachkina-Glushkovskaya O., Abdurashitov A., Dubrovsky A., Bragin D., Bragina O., Shushunova N., Maslyakova G., Navolokin N., Bucharskaya A., Tuchin V., Kurths J., Shirokov A. Application of optical coherence tomography for in vivo monitoring of the meningeal lymphatic vessels during opening of blood–brain barrier: mechanisms of brain clearing // *J. of Biomed. Optics.* 2017. Vol. 22, № 12. P. 12.
19. Semyachkina-Glushkovskaya O., Chehonin V., Borisova E., Fedosov I., Namykin A., Abdurashitov A., Shirokov A., Khlebtsov B., Lyubun Y., Navolokin N., Ulanova M., Shushunova N., Khorovodov A., Agranovich I., Bodrova A., Sagatova M., Shareef A., Saranceva E., Iskra T., Dvoryatkina M., Zhinchenko E., Sindeeva O., Tuchin V., Kurths J. Photodynamic opening of the blood-brain barrier and pathways of brain clearing // *J. of Biophotonics.* 2018. Vol. 11, № 11. DOI: 10.1002/jbio.201700287
20. Yamamoto T., Narushima M., Yoshimatsu H., Yamamoto N., Oka A., Seki Y., Todokoro T., Iida T., Koshima I. Indocyanine green velocity : lymph transportation capacity deterioration with progression of lymphedema // *Ann. of Plastic Surgery.* 2013. Vol. 71, № 5. P. 591–594.
21. Absinta M., Ha S. K., Nair G., Sati P., Luciano N., Palisoc M., Louveau A., Zaghloul K., Pittaluga S., Kipnis J., Reich D. Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI // *Elife.* 2017. Vol. 6. DOI: 10.7554/eLife.29738

Lymphatic Meningeal Role in Processes of Brain Clearing: *in vivo* Visualization

E. N. Duarte Torres, A. S. Abdurashitov, A. A. Namykin, A. A. Shirokov, N. A. Shushunova, E. I. Sarantseva, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya

Erik N. Duarte Torres, <https://orcid.org/0000-0002-9070-0064>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, inkvision10@gmail.com

Arkadiy S. Abdurashitov, <https://orcid.org/0000-0003-0731-8364>, Saratov State University, Research-Educational Institute of Optics and Biophotonics, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, abdurashitov-optics@mail.ru

Anton A. Namykin, <https://orcid.org/0000-0002-9945-8542>, Saratov State University, Research-Educational Institute of Optics and Biophotonics, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, anton-namikin@bk.ru

Aleksandr A. Shirokov, <https://orcid.org/0000-0003-3239-7877>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPFM RAS), 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, shirokov_a@ibppm.ru

Natalia A. Shushunova, <https://orcid.org/0000-0001-5366-1783>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, shushunovan.a@gmail.com



Elena I. Sarantseva, <https://orcid.org/0000-0002-3507-7708>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, sophora68@mail.ru

Oksana V. Semyachkina-Glushkovskaya, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 82, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

In the experiments on rats, *Evans Blue* dye and gold nanorods were injected into the brain parenchyma, followed by visualization with optical coherent tomography and a fluorescent microscopy. The results showed that meningeal lymphatics play an important role in the brain clearing, using markers introduced into the tissues. It has

been shown that the deep cervical lymph node is the first anatomical "station" for the outflow of fluid from the brain. The data obtained shed light on the lymphatic mechanisms underlying the drainage and clearing of brain functions.

Key words: meningeal lymphatic system, optical coherence tomography, fluorescence microscopy, *Evans Blue*, gold nanorods.

Acknowledgements: *This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-15-01263).*

We thank Dr. B. N. Khlebtsov (Laboratory of Nanobiotechnologies IBPMM RAS, Saratov) for the synthesis, optical characterization and functionalization of gold nanorods.

Образец для цитирования:

Дуарте Торрес Э. Н., Абдурашитов А. С., Намыкин А. А., Широков А. А., Шушунова Н. А., Саранцева Е. И., Семячкина-Глушковская О. В. Роль менингеальной лимфатики в процессах очищения мозга: визуализация *in vivo* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 433–438. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-433-438>

Cite this article as:

Duarte Torres E. N., Abdurashitov A. S., Namykin A. A., Shirokov A. A., Shushunova N. A., Sarantseva E. I., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Lymphatic Meningeal Role in Processes of Brain Clearing: *in vivo* Visualization. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 433–438 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-433-438>



УДК 579.26

ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К РИФАМПИЦИНУ У БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*



Е. Ю. Селиверстова, В. А. Выростков, Е. В. Яровая,
М. П. Куликов, В. Ю. Дробот, И. С. Сазыкин, М. А. Сазыкина

Селиверстова Екатерина Юрьевна, аспирант кафедры экологии и природопользования Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, seliverstova9@yandex.ru

Выростков Владимир Андреевич, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, vova3270@gmail.com

Яровая Екатерина Васильевна, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, ekyarova@sfedu.ru

Куликов Максим Павлович, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, makkulikov@sfedu.ru

Дробот Валерия Юрьевна, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, drobot_9626@mail.ru

Сазыкин Иван Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии и молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, issa@sfedu.ru

Сазыкина Марина Александровна, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией экологии и молекулярной биологии микроорганизмов Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, samara@sfedu.ru

Распространению антибиотикорезистентности среди бактерий в природе может способствовать антропогенный прессинг, оказываемый на экосистемы. В связи с этим целью настоящей работы состояла в исследовании влияния отдельных биоцидов, антибиотиков, пестицидов и тяжелых металлов на возникновение устойчивых к рифампицину мутантов *Pseudomonas putida*. Для оценки влияния токсических веществ на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов в питательную среду перед посевом на чашки добавляли исследуемые вещества и рифампицин в конечной концентрации 100 мкг/мл. В ходе проведенного эксперимента было показано стимулирующее влияние клопиралида и глифосата на данный процесс. Наиболее ярко выраженный эффект наблюдался в случае применения глифосата в концентрации 0,67 мг/мл. Полученные в ходе исследования результаты указывают на высокий риск распространения устойчивости к антибиотикам среди микробных сообществ почв, подверженных обработке пестицидами.

Ключевые слова: *Pseudomonas putida*, антибиотикорезистентность, рифампицин-устойчивые мутанты, рифампицин, клопиралид, глифосат.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-439-445>

Введение

Проблема резистентности к антибиотикам в микробных сообществах в настоящее время является глобальной проблемой здравоохранения. Этому способствовало широкое использование препаратов данной группы вне клинических ситуаций, а также в животноводстве и птицеводстве, где они применяются не только для профилактики заболеваний, но и в качестве стимуляторов роста [1]. Известно, что темпы создания новых антибиотиков значительно снизились по сравнению с периодом с 1960 г. до середины 1980-х гг. [2].

В настоящее время значительное количество исследований посвящено поиску новых антибиотиков [3, 4]. Исследуется также вопрос комбинированного действия препаратов и перекрестной резистентности к антибиотикам [5].

Важно, однако, отметить, что проблема антибиотикорезистентности среди клинически значимых микроорганизмов уходит своими корнями в сложные экологические и эволюционные отношения между самими микроорганизмами, сложившиеся задолго до появления человека как биологического вида [6, 7]. Между тем антропогенный прессинг, оказываемый на экосистемы, может способствовать распространению антибиотикорезистентности среди бактерий в природе. Так, имеются данные, указывающие на связь между возникновением антибиотикорезистентности у бактерий и загрязнением почв тяжелыми металлами [8]. Кроме того, есть причины полагать, что широкое использование биоцидов связано с риском распространения бактерий, устойчивых к антибиотикам [9, 10]. Известно также о способности инсектицидов приводить к возрастанию резистентности к антибиотикам среди почвенных бактерий сельскохозяйственных почв [11], а также о существовании перекрестной резистентности к пестицидам и антибиотикам [12].



В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было выяснить влияние различных токсических веществ на примере отдельных антибиотиков, биоцидов, пестицидов и солей тяжелых металлов на возникновение устойчивости к рифампицину у бактерий рода *Pseudomonas*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия их культивирования

В работе использовался штамм *Pseudomonas putida*, выделенный из донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС.

Для культивирования штамма использовалась минимальная среда М9 с добавлением солянокислого гидролизата казеина и глюкозы в конечных концентрациях 0,4 и 0,2 % соответственно [13] и среда Луриа – Бергани (LB) при 30°C [14].

Оценка влияния поллютантов на возникновение устойчивых к рифампицину мутантов Pseudomonas putida

Для получения мутантов, устойчивых к рифампицину, штамм культивировали в жидкой среде М9 с добавлением гидролизата казеина и глюкозы в течение 21 ч при 30°C с использованием шейкера-инкубатора Innova 40R («New Brunswick») до достижения поздней логарифмической фазы роста.

Полученную культуру разводили средой М9 до плотности 1 ед. МакФарланда (мутность суспензии определяли при помощи денситометра DEN-1 «BioSan») и далее последовательно разводили до плотности 10^5 кл/мл, после чего культивировали в течение 18 ч при 30°C.

Ночную культуру разводили средой М9 до плотности $\approx 1,8 \cdot 10^9$ кл/мл и в количестве 100 мкл вносили в чашки с плотной LB с добавлением среды М9 и рифампицина в конечных концентрациях 10% и 100 мкг/мл соответственно [13]. Для оценки влияния токсических веществ на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов в питательную среду перед посевом на чашки добавляли следующие исследуемые вещества в указанных концентрациях (в соответствии с инструкцией производителя, а также в 10 и в 100 раз меньше):

– пестициды: клопиралид («Лонтрел») в конечных концентрациях 30, 3 и 0,3 мкг/мл и глифосат (в виде изопропиламинной соли, «Агрокиллер») в конечных концентрациях 6700, 670 и 67 мкг/мл;

– биоциды: хлоргексидина биглюконат («Росбио») в конечных концентрациях 50, 5 и 0,5 мкг/мл и диоксидин («Новосибхимфарм») в

конечных концентрациях 1000, 100 и 10 мкг/мл;

– антибиотики: ампициллин («Синтез») в конечных концентрациях 25, 2,5 и 0,25 мкг/мл и окситетрациклина гидрохлорид («Агрофарм»): в конечных концентрациях 25, 2,5 и 0,25 мкг/мл.

Для оценки влияния солей тяжелых металлов на возникновение рифампицин-устойчивых мутантов *Pseudomonas putida* были отобраны концентрации, не оказывающие угнетающего эффекта на клеточный метаболизм [15]:

– хлорид ртути (HgCl_2 , «Акватест»): 27,2, 2,72 и 0,272 мкг/мл; – сульфат меди (CuSO_4 , «Акватест»): 100, 10 и 1 мкг/мл.

Количество выросших колоний учитывали через 72 ч после начала инкубации. В качестве положительного контроля был использован N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин в конечной концентрации 5 мкг/мл. Отрицательным контролем служил посев на плотную питательную среду, дополненную лишь рифампицином.

Все опыты проводились в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение

Влияние пестицидов, антибиотиков, биоцидов и солей тяжелых металлов на возникновение устойчивых к рифампицину мутантов Pseudomonas putida

В результате проведенного исследования было показано стимулирующее влияние таких пестицидов, как клопиралид и глифосат на появление устойчивых к рифампицину мутантов *Pseudomonas putida*. Связь между устойчивостью к пестицидам, в том числе и к глифосату, и резистентностью к антибиотикам на примере *Salmonella enterica* показана также Rivera-Ramírez с соавт. [16]. В проведенном нами исследовании наиболее ярко выраженный эффект наблюдался в случае применения глифосата в концентрации 670 мкг/мл (рис.1).

Клопиралид также оказал стимулирующее влияние на появление мутантов, однако менее выраженное и в самой высокой из исследуемых концентраций, которая рекомендована в качестве рабочей в инструкции по использованию данного вещества (рис. 2).

Ни одно из исследуемых веществ, относящихся к антибиотикам, пестицидам и солям тяжелых металлов, не оказало стимулирующего влияния на появление устойчивых к рифампицину мутантов *Pseudomonas putida*. Напротив, такие вещества, как тетрациклин, диоксидин и хлорид ртути, во всех исследованных концентрациях (включая самые низкие) оказали ярко выраженное подавляющее действие на возникновение мутантов (рис. 3, 4, 5).

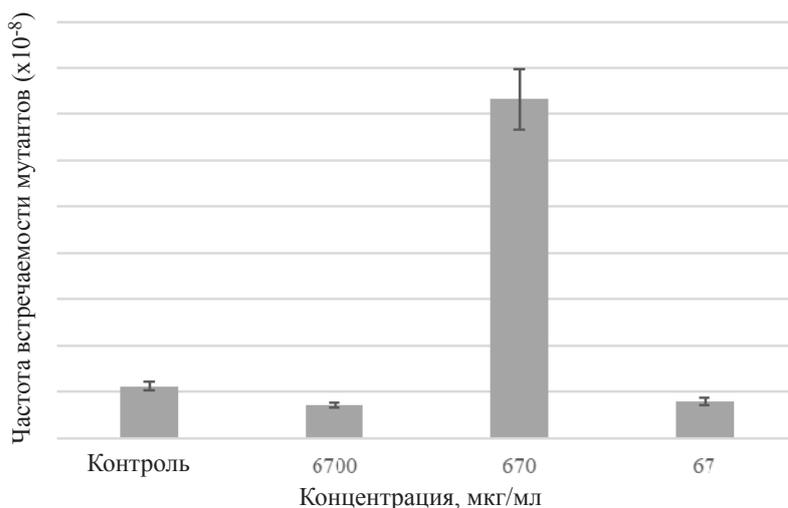


Рис. 1. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием глифосата

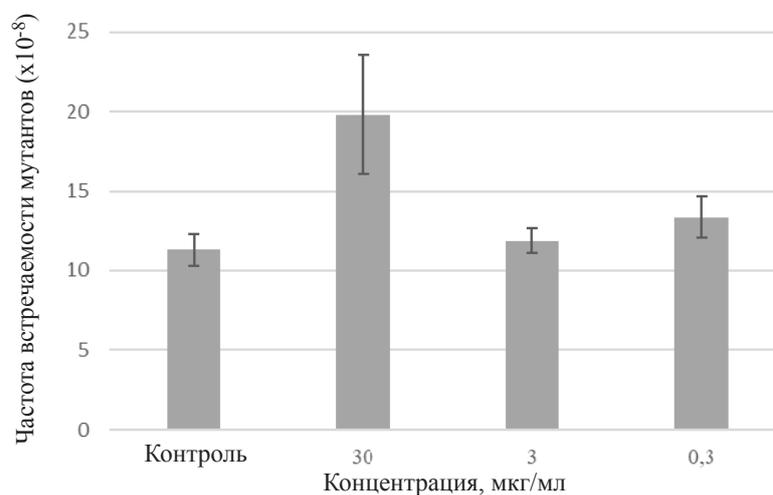


Рис. 2. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием клопиралида

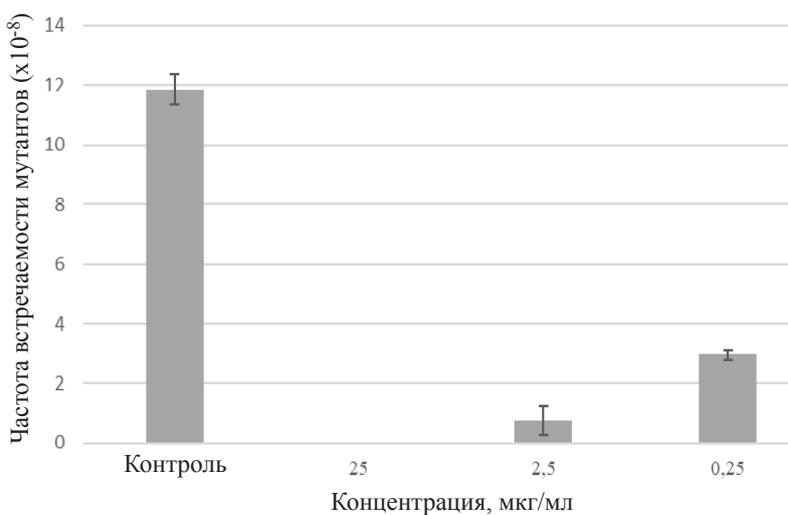


Рис. 3. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием тетрациклина

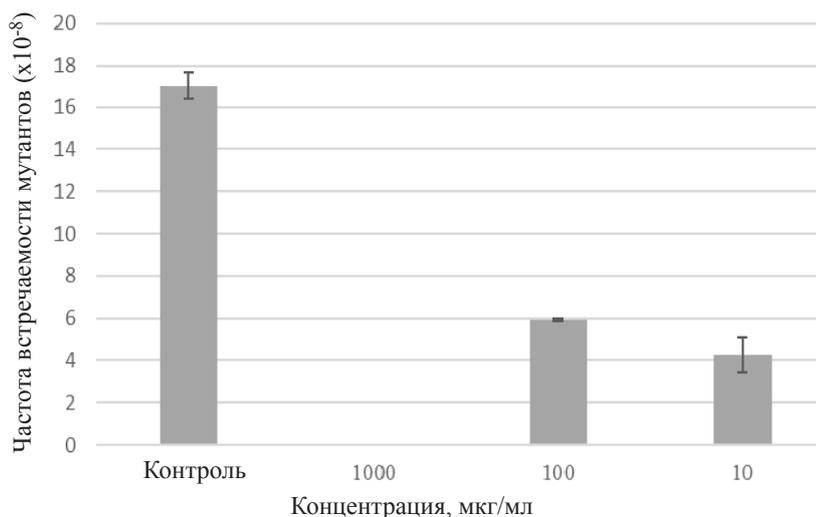


Рис. 4. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием диоксицина

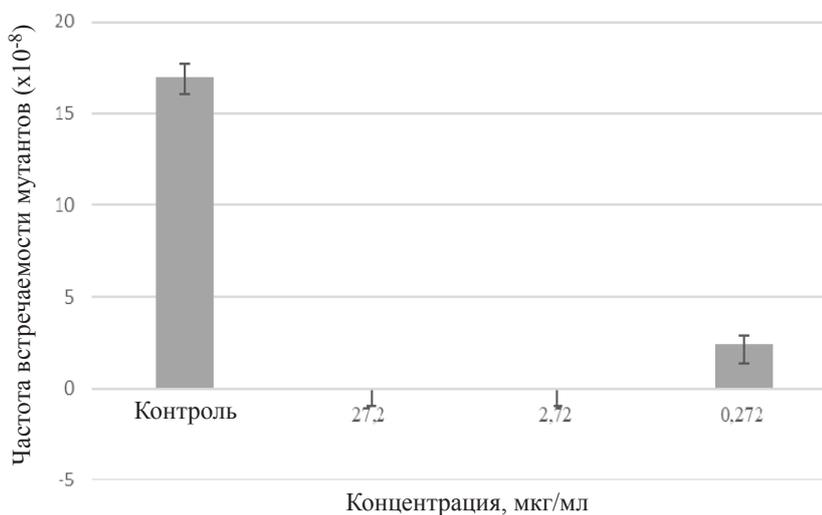


Рис. 5. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием $HgCl_2$

В настоящее время роль биоцидов, антибиотиков и солей тяжелых металлов в распространении лекарственной устойчивости в микробных сообществах до конца не выявлена в связи с тем, что на данный процесс оказывают свое влияние различные факторы. Так, в проведенном нами исследовании ярко выраженный угнетающий эффект хлоргексидина на возникновение мутантов, устойчивых к рифампицину, был выявлен только при самой высокой из исследуемых концентраций хлоргексидина (50 мкг/мл), в то время как при использовании хлоргексидина в более низких концентрациях наблюдалось практически сопоставимое с контролем появление мутантов *Pseudomonas putida* (рис. 6). Это согласуется с данными, полученными Wu с соавт. [17] для *Staphylococ-*

cus aureus, свидетельствующими о повышении устойчивости к антибиотикам под воздействием хлоргексидина.

Напротив, под воздействием ампициллина и сульфата меди количество мутантов, приближающееся по значению к контролю, было выявлено в случае использования более высоких концентраций данных веществ: 25 и 100 мкг/мл соответственно (рис. 7, 8).

Вполне вероятно, что в определенных условиях эти вещества могут способствовать распространению лекарственной устойчивости в природных микробных сообществах, однако для подтверждения вышеописанной гипотезы требуется проведение дальнейших исследований с использованием бактерий различных родов и широкого спектра токсических веществ.

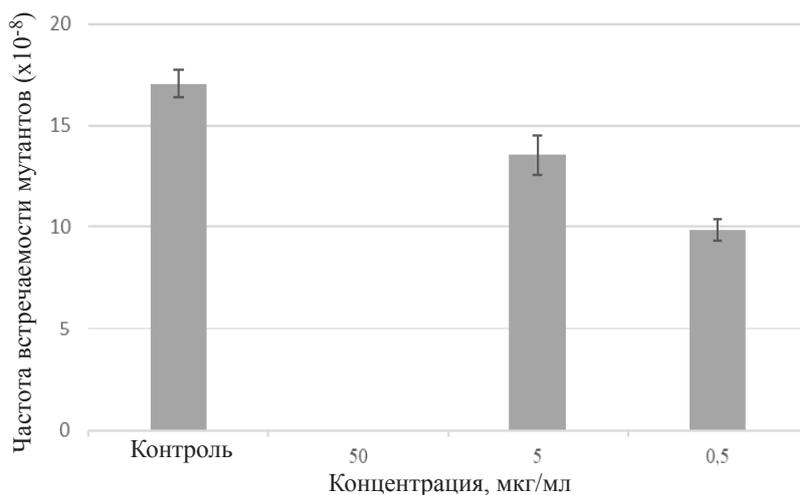


Рис. 6. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием хлоргексидина

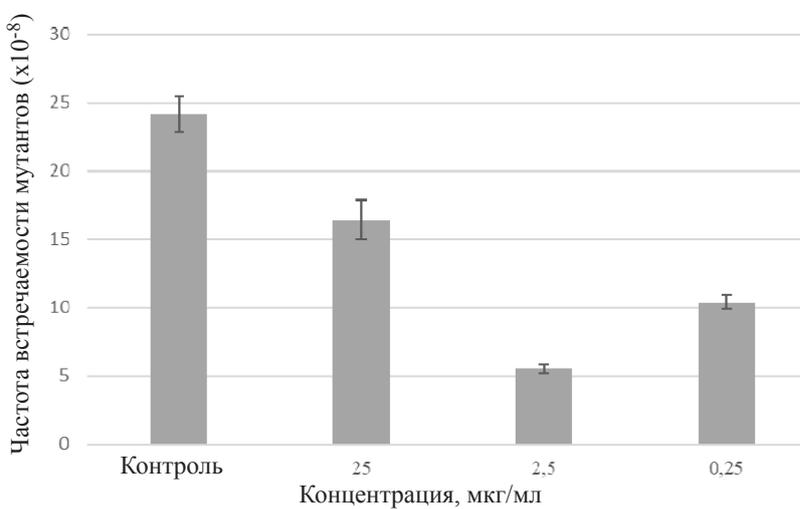


Рис. 7. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием ампициллина

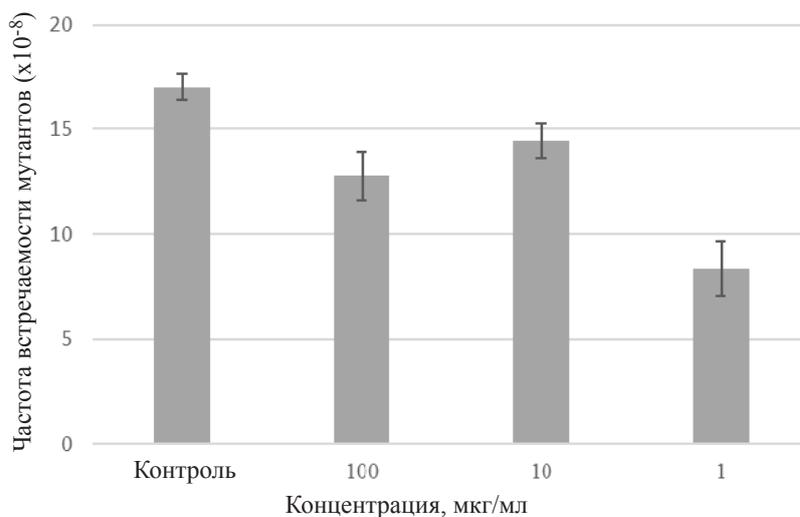


Рис. 8. Количество мутантов *Pseudomonas putida*, устойчивых к рифампицину, полученных под воздействием CuSO_4



Заклучение

Полученные в ходе исследования результаты указывают на высокий риск распространения устойчивости к антибиотикам среди микробных сообществ почв, подверженных обработке пестицидами. Тем не менее следует отметить, что данные были получены в результате лабораторного эксперимента и требуется дальнейшее изучение данной проблемы в условиях, приближенных к естественным.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 6.2379.2017/ПЧ) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00787 А).

Список литературы

1. Сазыкина М. А., Сазыкин И. С., Хмелевцова Л. Е., Хаммами М. И., Селиверстова Е. Ю. Антибиотики и гены антибиотикорезистентности в окружающей среде // Вестн. биотехнологии и физ.-хим. биологии им. Ю. А. Овчинникова. 2016. Т. 12, № 2. С. 30–40.
2. Yılmaz Ç., Özcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps // Biochem. Pharmacology. 2017. Vol. 133. P. 43–62.
3. Ling L. L., Schneider T., Peoples A. J., Spoering A. L., Engels I., Conlon B. P., Mueller A., Schäberle T. F., Hughes D. E., Epstein S., Jones M., Lazarides L., Steadman V. A., Cohen D. R., Felix C. R., Fetterman K. A., Millett W. P., Nitti A. G., Zullo A. M., Chen C., Lewis K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance // Nature. 2015. Vol. 517. P. 455–459.
4. Kim H. U., Blin K., Lee S. Y., Weber T. Recent development of computational resources for new antibiotics discovery // Current Opinion in Microbiology. 2017. Vol. 39. P. 113–120.
5. Suzuki S., Horinouchi T., Furusawa C. Suppression of antibiotic resistance acquisition by combined use of antibiotics // J. of Biosci. and Bioengineer. 2015. Vol. 120, № 4. P. 467–469.
6. Сунотницкий М. В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // Биопрепараты. 2011. № 2. С. 4–11.
7. Rolain J. M., Abat C., Jimeno M.-T., Fournier P.-E., Raoult D. Do we need new antibiotics? // Clinical Microbiology and Infection. 2016. Vol. 22, № 5. P. 408–415.
8. Safari Sinegani A. A., Younessi N. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses // J. of Global Antimicrob. Resist. 2017. Vol. 10. P. 247–255.
9. Weggate R., Grasha P., Maillard J.-Y. Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage // Amer. J. of Infect. Control. 2016. Vol. 44. P. 458–464.

10. Molina-González D., Alonso-Calleja C., Alonso-Hernando A. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains // Food Control. 2014. Vol. 40. P. 329–334.
11. Rangasamy K., Athiappan M., Devarajan N., Parray J. A. Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides // Microb. Pathogen. 2017. Vol. 105. P. 153–165.
12. Rangasamy K., Athiappan M., Devarajan N., Samyannu G., Parray J. A., Aruljothi K. N., Shameem N., Alqarawi A. A., Hashem A., Abd-Allah E. F. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora // Microb. Pathogen. 2018. Vol. 114. P. 304–310.
13. Jatsenko T., Tover A., Tegova R., Kivisaar M. Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* // Mutation Res. 2010. Vol. 683. P. 106–114.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1982. 479 p.
15. Сазыкина М. А., Чистяков В. А., Сазыкин И. С., Лагутова Л. П., Новикова Е. М., Латышев А. И. Использование бактериального lux-биосенсора для детекции загрязнения природных вод ртутью // Вода: химия и экология. 2010. № 5. С. 24–29.
16. Rivera-Ramírez X. O., Hernández-Ojeda S. L., Espinosa-Aguirre J. J., Camacho-Carranza R. Antibiotic resistance mutations in bacteria selected by exposure to pesticides // Toxicol. Lett. 2016. Vol. 259. Supplement. P. S218–S219. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.07.52
17. Wu D., Lu R., Chen Yu., Deng Chao., Tan Q. Study of cross-resistance mediated by antibiotics, chlorhexidine and Rhizoma coptidis in *Staphylococcus aureus* // J. of Global Antibiotic Resistance. 2016. № 7. P. 61–66.

The Effect of Pollutants on the Emergence of Rifampicin Resistance in Bacteria of the *Pseudomonas* Genus

E. Yu. Seliverstova, V. A. Vyrostkov,
E. V. Yarovaya, M. P. Kulikov, V. Yu. Drobot,
I. S. Sazykin, M. A. Sazykina

Ekaterina Yu. Seliverstova, <https://orcid.org/0000-0002-2940-803X>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, seliverstova9@yandex.ru

Vladimir A. Vyrostkov, <https://orcid.org/0000-0001-8536-3297>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, vova3270@gmail.com

Ekaterina V. Yarovaya, <https://orcid.org/0000-0003-3192-8541>, Southern Federal University, 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, ekyarovaya@sfedu.ru

Maxim P. Kulikov, <https://orcid.org/0000-0002-0350-0145>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, Russia, 344090, makkulikov@sfedu.ru



Valeria Yu. Drobot, <https://orcid.org/0000-0002-7924-1696>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, drobot_9626@mail.ru

Ivan S. Sazykin, <https://orcid.org/0000-0002-0864-1473>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, issa@sfedu.ru

Marina A. Sazykina, <https://orcid.org/0000-0001-6974-3361>, Southern Federal University, 194/1, Stachki Ave., Rostov-on-Don, 344090, Russia, samara@sfedu.ru

The anthropogenic pressure on ecosystems may contribute to the spread of antibiotic resistance among bacteria in natural conditions. Due to this, the aim of this work was to study the impact of specific biocides, antibiotics, pesticides and heavy metals on the emergence of rifampicin resistant mutants of *Pseudomonas putida*. To assess the impact of toxic substances on the emergence of rifampicin-resistant mutants the studied substances

and rifampicin in the final concentration of 100 µg/ml were added into nutrient medium before plating. In the course of the experiment the stimulating effects of clopyralid and glyphosate on the process were shown. The most pronounced effect was observed in the case of glyphosate application in the concentration of 0.67 mg/ml. The obtained results indicate high risk of spreading antibiotic resistance among the microbial communities of soils subjected to treatment with pesticides.

Key words: *Pseudomonas putida*, antibiotic resistance, rifampicin-resistant mutants, rifampicin, clopyralid, glyphosate.

Acknowledgements: *This work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the framework of scientific (project no. 6.2379.2017/PC) and of the Russian Foundation for Basic Researches (project no. 17-04-00787 A).*

Образец для цитирования:

Селиверстова Е. Ю., Выrostков В. А., Яровая Е. В., Куликов М. П., Дробот В. Ю., Сазыкин И. С., Сазыкина М. А. Влияние загрязняющих веществ на возникновение устойчивости к рифампицину у бактерий рода *Pseudomonas* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 439–445. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-439-445>

Cite this article as:

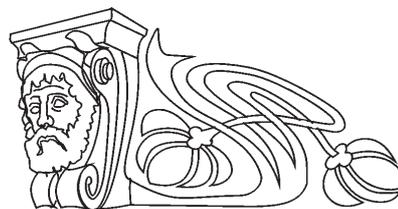
Seliverstova E. Yu., Vyrostkov V. A., Yarovaya E. V., Kulikov M. P., Drobot V. Yu., Sazykin I. S., Sazykina M. A. The Effect of Pollutants on the Emergence of Rifampicin Resistance in Bacteria of the *Pseudomonas* Genus. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 439–445 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-439-445>



УДК 616-006.484

РАЗВИТИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГЛИОМЫ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ БЕТА2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

А. П. Хороводов, А. А. Широков, Н. А. Новолокин, А. В. Терсков,
Э. А. Лаубертс, А. Т. Мамедова, Н. А. Шушунова, И. М. Агранович,
М. В. Уланова, А. А. Бодрова, О. В. Семячкина-Глушковская



Хороводов Александр Петрович, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, khorovodov2012@yandex.ru

Широков Александр Александрович, кандидат биологических наук, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shirokov_a@ibppm.ru

Новолокин Никита Александрович, аспирант кафедры патологической анатомии, ассистент кафедры патологической анатомии, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, nik-navolokin@yandex.ru

Терсков Андрей Витальевич, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, terskow.andrey@gmail.com

Лаубертс Эльза Артемовна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, laubertselza@gmail.com

Мамедова Айсел Тофик-Кызы, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, mamedovaysel95@gmail.ru

Шушунова Наталья Александровна, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, shushunovan.a@gmail.com

Агранович Илана Михайловна, аспирант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ilana.agranovich@yandex.ru

Уланова Мария Васильевна, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, maru-ulanova@mail.ru

Бодрова Анастасия Алексеевна, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, nastya1535@mail.ru

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, glushkovskaya@mail.ru

В данном исследовании показана роль адренергических механизмов в развитии флуоресцентной глиомы у крыс и связанное с этим нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Результаты показали, что прогрессирование глиомы сопровождалось постепенным повышением проницаемости ГЭБ на фоне увеличения экспрессии бета2-адренорецепторов (Б2-АР). Фармакологическая блокада Б2-АР уменьшала степень нарушения ГЭБ, миграцию раковых клеток и увеличивала продолжительность жизни животных. Наши данные подтверждают идею о том, что блокада Б2-АР может быть новой терапевтической стратегией для лечения глиомы и предотвращения метастазов.

Ключевые слова: глиома, ГЭБ, бета2-адренорецепторы.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-446-450>

Введение

Глиомы являются летальными формами опухолей головного мозга, которые составляют примерно 30% всех новообразований [1].

Средняя продолжительность жизни пациентов с момента постановки диагноза составляет всего 15 месяцев, менее 5% пациентов живут дольше 5 лет из-за 80% рецидива агрессивной глиомы [2,3]. Высокая частота рецидивов, плохая реакция на лечение и низкие показатели продолжительности жизни делают злокачественную глиому наиболее опасным новообразованием.

Глиома быстро распространяется и может колонизировать весь мозг, так как опухолевые инвазивные клетки довольно быстро распространяются далеко за пределами основной массы опухоли [4]. Образование глиомы характеризуется высокой плотностью микрососудов, в которых выявляется масса дефектов, аномальная морфология и нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [4,5]. Несмотря на многочисленные исследования формирования и прогрессирования глиомы, состояние ГЭБ на фоне развития опухоли остается малоизученным.

В последнее десятилетие стало очевидным, что связанная со стрессом активация симпатической нервной системы (СНС) играет важную роль в развитии опухоли и регуляции микрососудов мозга [6, 7]. Клинические исследования показывают, что глиома часто ассоциируется с высоким уровнем катехоламинов, а блокада бета 2-адренорецепторов (Б2-АР) улучшает результаты



лечения больных раком [8, 9]. Вовлечение B2-AP и бета-аррестина-1 как ко-фактора сигнальной трансмембранной передачи нервного импульса в развитие различных форм онкологии показано во многих исследованиях [10, 11]. Однако роль СНС и, в частности, B2-AP в механизмах, ответственных за прогрессирование глиомы, остается плохо изученной и требует дальнейших исследований. Для лучшего понимания адренергических механизмов, лежащих в основе развития глиомы, в данной работе исследовали эффекты фармакологической модуляции B2-AP на развитие и миграцию флуоресцентной глиомы у крыс.

Материалы и методы

Объекты исследования

Эксперименты проводились на самцах белых беспородных крыс массой 250 г. Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и эксплуатации лабораторных животных». Протокол эксперимента одобрен Комитетом по уходу и эксплуатации лабораторных животных Саратовского государственного университета (протокол № 7, 07.02.2018).

Группы животных

Экспериментальные животные были разделены на три группы:

1) крысы с глиомой (контроль), которые получали физиологический раствор в том же объеме, что препараты, модулирующие активность B2-AP;

2) крысы с глиомой, которым вводили изопротеренол (агонист B2-AP, 25 мг / кг / день, per os, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США);

3) крысы с глиомой, которым вводили ICI-118551 (специфический антагонист B2-AP, 25 мг / кг / день, per os, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Крысам вводили препараты в течение всех дней после имплантации раковых клеток.

Три указанные группы были разделены на 4 подгруппы: через 3–7 – 10–28 дней после имплантации раковых клеток для конфокальной визуализации и гистологического анализа тканей головного мозга. Каждая подгруппа включала 10 животных.

Время жизни животных оценивали у 10 крыс из трех основных групп (контроль, ICI-118551 и изопротеренол), в этих группах крысы жили до смерти.

Получение клеточной культуры флуоресцентной глиомы

Клетки C6 культивировали в среде DMEM (Paneco, Россия), содержащей 2,5% эмбриональной сыворотки телят (Biosera), глутамина 4 мм (Paneco, Россия), пенициллина (50 МЕ/мл)

и стрептомицина (50 мг/мл) (Paneco, Россия). Для удаления клеток с поверхности чашки Петри использовали раствор Versene (Paneko, Россия) с добавлением 0,25% трипсина (Gibco). Клетки культивировали в инкубаторе CO₂ при 37°C с содержанием 5% CO₂.

Для получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих белок TagRFP, клетки C6, трансфицировали лентивирусами LVTTagRFP (Evrogen, cat. LP001) в случае множественности заражения 10 вирусных частиц на клетку. Полученные клеточные линии выращивали до количества не менее 106 клеток и замораживали в среде для роста DMEM, содержащей 45% эмбриональной сыворотки телят и 10% ДМСО. Экспрессия соответствующих флуоресцентных белков в полученных клеточных линиях была подтверждена флуоресцентной микроскопией на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Методы оценки проницаемости ГЭБ

Использовали метод конфокальной визуализации экстравазации FITC-декстран 70 кДа (40 мг / 250 г, 0,5% раствор в 0,9% физиологическом растворе, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Время циркуляции в кровотоке составляло 2 мин. Затем крыс декапетировали, их мозг извлекали из черепной коробки и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 24 ч в соответствии с протоколом, представленным в публикации [12]. Далее делали срезы тканей мозга толщиной 50 мкм на вибротоме (Leica VT 1000S Microsystem, Германия) и анализировали на конфокальном микроскопе (Leica TCS SP8, Leica, Germany). Исследовали 8–12 срезов с каждого мозга.

Гистологический анализ тканей и сосудов мозга

Мозг извлекали и помещали на сутки в забуференный формалин 10%. Готовили образцы тканей мозга толщиной 4–5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Результаты оценивали с помощью световой микроскопии с использованием системы цифрового анализа изображений MikroVizor medical mVizo-103 (ЛОМО, Россия).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы анализировали эффекты фармакологической блокады и стимуляции B2-AP на развитие глиомы и выживаемость животных с использованием конфокальной визуализации, гистологического анализа и определения времени смерти у крыс.

Рис. 1, а показывает флуоресцентную глиому через 28 дней после имплантации раковых клеток у крыс из первой группы, т.е. тех животных, у которых опухоль развивалась без фармакологи-

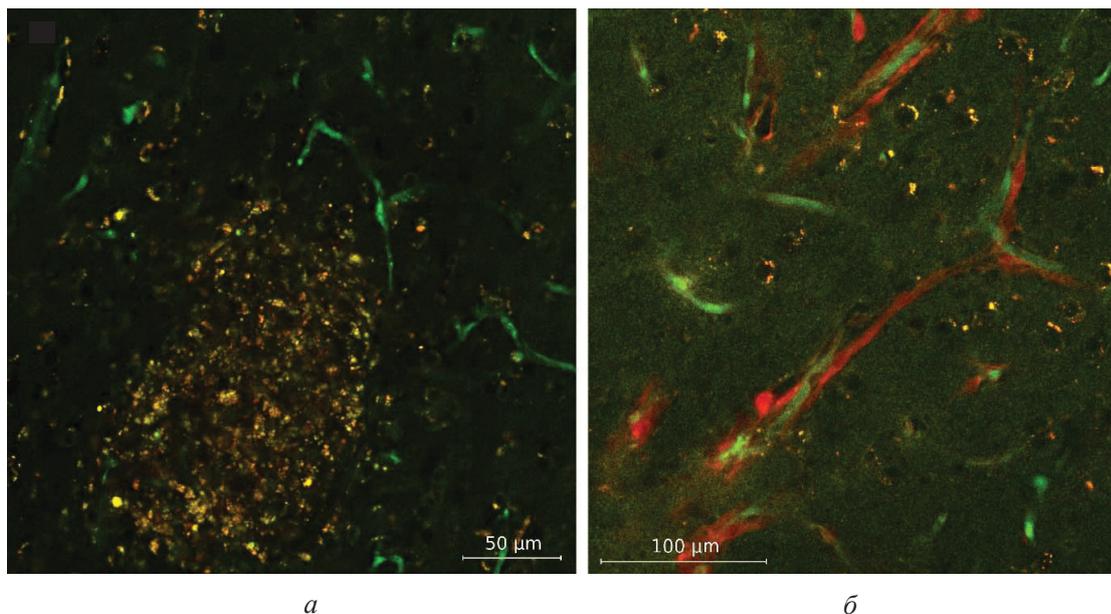


Рис. 1. Анализ прогрессии глиомы без (а) и с (б) фармакологической стимуляцией бета2-адренорецепторов: а – конфокальная визуализация флуоресцентной глиомы (желтый цвет за счет слияния красного и зеленого цветов, что объясняется высокой проницаемостью ГЭБ. Зеленый FITC-декстран выходит из церебральных сосудов и наблюдается между красными клетками глиомы. За счет этого отмечается слияние цветов) через 28 дней после имплантации раковых клеток; зеленый цвет – церебральные сосуды, заполненные FITC-декстраном 70 кДа; б – миграция глиомных клеток (красный цвет) по сосудам (зеленый цвет) головного мозга

ческих влияний. Гистологический анализ тканей мозга в этой группе показал клеточный полиморфизм, т.е. клетки разного размера и формы, что является типичным признаком глиомы (рис. 2). Без фармакологического воздействия метастазы наблюдались у 40% (4 из 10) крыс в период между 10-м и 28-м днем после имплантации глиомных клеток (см. рис. 2). Животные умирали через 28–35 дней после начала роста глиомы.

У всех крыс (10 из 10), которым вводили изопротеренол (агонист Б2-АР), были обнаружены метастазы через 7 дней после имплантации раковых клеток, которые мигрировали вдоль сосудов головного мозга (см. рис. 1, б). Животные умирали между 18–22-м днями после имплантации раковых клеток, то есть продолжительность жизни в этой группе была ниже в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой.

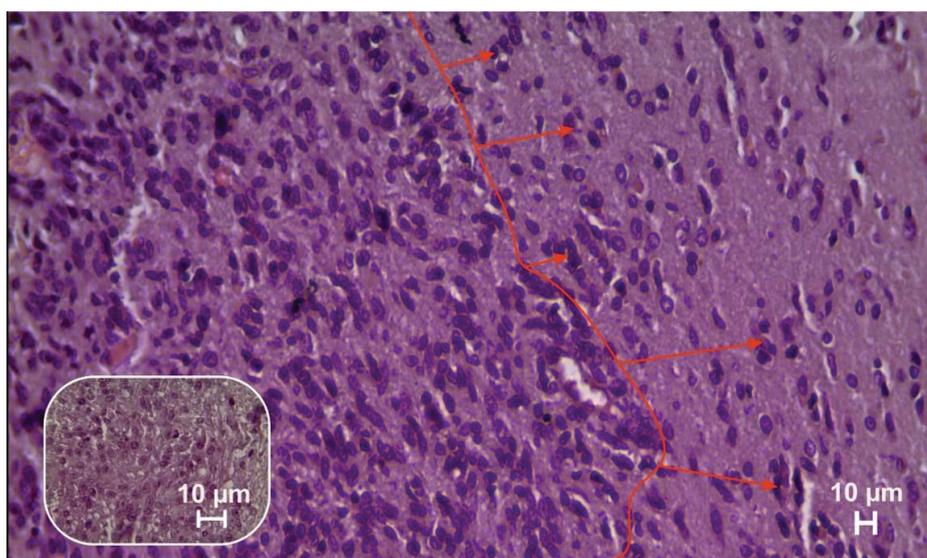


Рис. 2. Гистологический анализ тканей головного мозга крысы с глиомой



Блокада Б2-АР уменьшала миграцию раковых клеток. В этой группе только у 20% крыс (2 из 10) отмечались метастазы. Продолжительность жизни животных была увеличена до 43–47 дней после начала развития глиомы, что в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой.

Заключение

Блокада Б2-АР ICI-118551 уменьшает миграцию глиомных клеток и увеличивает продолжительность жизни крыс. Стимуляция Б2-АР изопротеренолом вызывает противоположные эффекты, т.е. сопровождается ранней миграцией опухолевых клеток, и уменьшает срок жизни животных. Результаты, полученные в ходе исследования, подтверждают возможность создания новой терапевтической стратегии терапии глиомы, а именно блокады Б2-АР.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-75-20069).

Список литературы

1. Wöhrer A., Waldhör T., Heinzl H., Hackl M., Feichtinger J., Gruber-Mösenbacher. The Austrian Brain Tumour Registry : a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry // *J. of Neuro-Oncology*. 2009. Vol. 95, № 3. P. 401–411.
2. Jovčevska I., Kočevar N., Komel R. Glioma and glioblastoma-how much do we (not) know? // *Molec. and Clin. Oncology*. 2013. Vol. 1, № 6. P. 935–941.
3. Li R., Chen X., You Y., Wang X., Liu Y., Hu Q., Yan W. Comprehensive portrait of recurrent glioblastoma multiforme in molecular and clinical characteristics // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6, № 31. P. 30968.
4. Watkins S., Robel S., Kimbrough I. F., Robert S. M., Ellis-Davies G., Sontheimer H. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells // *Nature Commun.* 2014. Vol. 5. P. 4196.
5. Dvorak H. F. How tumors make bad blood vessels and stroma // *The Amer. J. of Pathology*. 2003. Vol. 162, № 6. P. 1747.
6. Cole S. W., Nagaraja A. S., Lutgendorf S. K., Green P. A., Sood A. K. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment // *Nat. Rev. Cancer*. 2015. Vol. 15, № 9. P. 563.
7. Qiao G., Chen M., Bucsek M. J., Repasky E. A., Hylan-der B. L. Adrenergic signaling : a targetable checkpoint limiting development of the anti-tumor immune response // *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 9. P. 164.
8. Eldeeb B. B., Hammond E. M., Worthington D. J., Mann J. R. Urinary catecholamines and their metabolites in management of neuroblastoma // *Pediatric Hematology and Oncology*. 1988. Vol. 5, № 3. P. 229–237.
9. De Giorgi V., Grazzini M., Gandini S., Benemei S., Lotti T., Marchionni N., Geppetti P. Treatment with β -blockers and reduced disease progression in patients with thick melanoma // *Arch. of Internal Med.* 2011. Vol. 171, № 8. P. 779–781.
10. Nguyễn L. T. H. The roles of beta-adrenergic receptors in tumorigenesis and the possible use of beta-adrenergic blockers for cancer treatment : possible genetic and cell-signaling mechanisms // *Cancer Manag. and Res.* 2012. Vol. 4. P. 431.
11. Song Q., Ji Q., Li Q. The role and mechanism of β -arrestins in cancer invasion and metastasis // *Intern. J. of Molecular Med.* 2018. Vol. 41, № 2. P. 631–639.
12. Hoffmann A., Bredno J., Wendland M., Derugin N., Ohara P., Wintermark M. High and Low molecular weight fluorescein Isothiocyanate (FITC)-dextrans to assess blood-brain barrier disruption : Technical considerations // *Transl. Stroke Res.* 2011. Vol. 2, № 1. P. 106–111.

Development of Fluorescent Glioma in Rats under Pharmacological Modulation of Beta2-Adrenergic Receptor

A. P. Khorovodov, A. A. Shirokov, N. A. Novolokin, A. V. Terskov, E. A. Lauberts, A. T. Mamedova, N. A. Shushunova, I. M. Agranovich, M. V. Ulanova, A. A. Bodrova, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya

Aleksandr P. Khorovodov, <https://orcid.org/0000-0002-5318-5200>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, khorovodov2012@yandex.ru

Aleksandr A. Shirokov, <https://orcid.org/0000-0003-3239-7877>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPFM RAS), 13, Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia, shirokov_a@ibppm.ru

Nikita A. Novolokin, <https://orcid.org/0000-0001-7876-9758>, Saratov State Medical Universit, 112, Bolshaya Kazachya Str., 410010 Russia, nik-navolokin@yandex.ru

Andrey V. Terskov, <https://orcid.org/0000-0003-1111-9990>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, terskov.andrey@gmail.com

Elza A. Lauberts, <https://orcid.org/0000-0003-3794-9677>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, laubertselza@gmail.com

Aysel T. Mamedova, <https://orcid.org/0000-0002-0229-0801>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, mamedovaysel95@gmail.ru

Natalia A. Shushunova, <https://orcid.org/0000-0001-5366-1783>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, shushunovan.a@gmail.com

Ilana M. Agranovich, <https://orcid.org/0000-0002-7903-3897>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilana.agranovich@yandex.ru



Maria V. Ulanova, <https://orcid.org/0000-0002-6516-1687>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, maru-ulanova@mail.ru

Anastasia A. Bodrova, <https://orcid.org/0000-0002-0300-7481>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, nastya1535@mail.ru

Oksana V. Semyachkina-Glushkovskaya, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

This study shows the role of adrenergic mechanisms in the development of fluorescent glioma in rats and the impairment of the

blood-brain barrier (BBB) permeability. The results demonstrate that the progression of glioma was accompanied by a gradual increase in the BBB permeability and an increased expression of vascular beta2-adrenoreceptors (B2-AR). The pharmacological blockade of B2-AR reduced the degree of BBB disruption, the migration of cancer cells and increased the survival of animals. Our data support the idea that blockade of B2-AP may be a new therapeutic strategy for the treatment of glioma and the prevention of metastases.

Key words: glioma, BBB, beta2-adrenoreceptors.

Acknowledgements: *This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-75-20069).*

Образец для цитирования:

Хороводов А. П., Широков А. А., Новолокин Н. А., Терсков А. В., Лаубертс Э. А., Мамедова А. Т., Шушунова Н. А., Агранович И. М., Уланова М. В., Бодрова А. А., Семьячкина-Глушковская О. В. Развитие флуоресцентной глиомы у крыс в условиях фармакологической модуляции бета2-адренорецепторов // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 446–450. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-446-450>

Cite this article as:

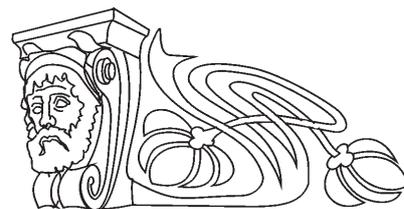
Khorovodov A. P., Shirokov A. A., Novolokin N. A., Terskov A. V., Lauberts E. A., Mamedova A. T., Shushunova N. A., Agranovich I. M., Ulanova M. V., Bodrova A. A., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Development of Fluorescent Glioma in Rats under Pharmacological Modulation of Beta2-Adrenergic Receptor. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 446–450 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-446-450>



УДК 579.68:574.5

БАКТЕРИООБРАСТАНИЯ В СИСТЕМЕ ТЕХНИЧЕСКОГО ВОДОСНАБЖЕНИЯ БАЛАКОВСКОЙ АТОМНОЙ ЭЛЕКТРОСТАНЦИИ

А. В. Кирилова, Е. В. Глинская, М. Ю. Воронин, А. С. Савельева



Кирилова Анна Вячеславовна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, anna.kirilova2017@yandex.ru

Глинская Елена Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, elenavg-2007@yandex.ru

Воронин Максим Юрьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры морфологии и экологии животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, voroninmj@yandex.ru

Савельева Александра Сергеевна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, saveleva.sasha13@mail.ru

Статья посвящена изучению бактериообрастаний в системе технического водоснабжения Балаковской атомной электростанции (БАЭС). Работу проводили в 2017 г. Пробы отбирали на следующих объектах: резервный дизель-генератор 3-го энергоблока (РДЭС-3), насосная станция подпитки пруда-охладителя (НППО), береговые насосные станции энергоблоков № 3 (БНС-3) и № 4 (БНС-4), машинные залы энергоблоков № 3 (МЗ-3) и № 4 (МЗ-4). Результаты показали, что на водонесущих конструкциях (БАЭС) формируется биологическая пленка, в составе которой обнаружены сапрофитные хемоорганотрофные мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные бактерии 5 родов (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Rheinheimera*, *Vibrio*), а также хемолитотрофные бактерии из группы железобактерий, находящиеся в ассоциации. Количественные показатели изолированных из биопленки видов варьировали от 10^2 до 10^8 микробных клеток в 1 мл. Выделенные микроорганизмы представлены широко распространенными в природных водных и почвенных экологических системах видами бактерий, однако некоторые виды изолированных родов бактерий являются условно-патогенными и могут вызывать инфекционные заболевания у человека и животных. Обнаружение их в водоемах может быть связано с благоприятными для сохранения и размножения условиями, в первую очередь значениями температурного фактора.

Ключевые слова: бактериообрастания, система технического водоснабжения, Балаковская АЭС, сапрофитные бактерии, железобактерии, условно-патогенные бактерии.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-451-454>

Введение

Биообрастания, в частности бактериальные обрастания гидротехнических сооружений, являются актуальной проблемой в различных отраслях промышленности, в том числе в атом-

ной энергетике. Биопленки развиваются на поверхностях труб, насосов и на погруженных в воду поверхностях емкостей и технологического оборудования. В системе водоснабжения они ухудшают качество воды и санитарно-техническое состояние водопроводной сети, забивают сетки, решетки, фильтры и трубы. При биообрастании значительно снижается пропускная способность трубопроводов, ухудшается работа теплообменников, возрастают затраты энергии на перекачку воды [1]. Биопленка служит основой для развития водорослей и моллюсков, понижает уровень pH, ускоряет коррозию бетона и металлов [2]. Для решения проблем, связанных с биологическими обрастаниями оборудования, необходимы комплексные исследования по изучению видового разнообразия микроорганизмов, растений и животных, поступающих из водоема и развивающихся в системе водоснабжения [3, 4].

Целью работы было выявление и идентификация микроорганизмов, входящих в состав биопленок и участвующих в процессе биообрастания водонесущих конструкций в системе технического водоснабжения БАЭС.

Материалы и методы

Отбор проб бактериообрастаний с поверхностей водонесущего оборудования осуществляли стандартными методами с использованием стерильных тупферов, предназначенных для взятия образцов биологического материала, с последующей безопасной транспортировкой в лабораторию для проведения анализа в ограниченные сроки. Тупферы с биологическими пробами хранили в условиях низких температур не более 12 часов.

Для доступа к смачиваемой поверхности весной 2017 г. к водонесущему оборудованию БАЭС были подключены специальные агрегаты, позволяющие осуществлять мониторинг биообрастаний [5]. Отбор проб проводили в летне-осенний период 2017 г. Пробы были отобраны на следующих объектах: резервный дизель-генератор 3-го энергоблока (РДЭС-3), насосная станция подпитки пруда-охладителя (НППО), береговые насосные станции энергоблока № 3 (БНС-3) и № 4 (БНС-4), машинные залы энергоблока № 3 (МЗ-3) и № 4 (МЗ-4).



Определение количественных показателей сапрофитных мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МА-ФАНМ) осуществляли стандартными методами [6]. Исследуемые пробы титровали до 10^{-4} . Далее осуществляли глубинный посев в ГРМ-агар (Россия, Оболенск). Посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 24–48 часов. Далее проводили количественный учет выросших колоний, определение индекса встречаемости выделенных видов и индекса общности сравниваемых проб.

Выделение железooksисляющих бактерий проводили на среде Лиске следующего состава: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,5 г; K_2HPO_4 – 0,05 г; KCl – 0,05 г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г; H_2O – 1 л; стерильная железная проволока. Культивирование осуществляли в течение 30 суток [6].

Видовую принадлежность бактерий определяли на основании анализа молекулярных маркеров гена 16S рРНК в ООО «Синтол» (г. Москва).

Статистическую обработку количественных показателей проводили с использованием программы Statistica 6.0. При статистической обработке полученных данных осуществляли расчет основных вероятностных характеристик случайных величин: первого или нижнего квартиля (25%), медианы (второго квартиля) для центрирования распределения и третьего или верхнего квартиля (75%).

Результаты и их обсуждение

Из биопленок, образуемых на водонесущих конструкциях, были выделены грамположительные и грамотрицательные бактерии 8 видов, являющиеся сапрофитами, хемоорганотрофами (таблица).

Видовой состав и количественные показатели (м.к./мл) бактериообрастаний в системе технического водоснабжения БАЭС

Вид бактерий	Объекты БАЭС											
	БНС-3		БНС-4		МЗ-3		МЗ-4		НППО		РДЭС-3	
	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %
<i>Aeromonas</i> sp.	–	–	–	–	$\frac{2,7^*}{0-5^{**}}$	70	–	–	–	–	$\frac{2,7}{0-5}$	70
<i>Bacillus halotolerans</i>	$\frac{2,3}{0-7}$	30	–	–	$\frac{4,3}{0-7}$	70	–	–	$\frac{1,7}{0-5}$	30	–	–
<i>Bacillus subtilis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	$\frac{4,0}{0-7}$	70
<i>Bacillus vallismortis</i>	$\frac{1,7}{0-5}$	30	–	–	–	–	–	–	–	–	$\frac{1,7}{0-5}$	30
<i>Dietzia maris</i>	–	–	$\frac{1,0}{0-3}$	30	–	–	–	–	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30
<i>Rheinheimera</i> sp.	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{0,7}{0-2}$	30	$\frac{0,7}{0-2}$	30
<i>Rheinheimera chironomi</i>	$\frac{4,7}{2-7}$	100	$\frac{0,7}{0-2}$	30	$\frac{4,0}{2-6}$	100	$\frac{0,7}{0-2}$	30	$\frac{5,0}{0-8}$	70	$\frac{4,0}{0-7}$	70
<i>Vibrio</i> sp.	$\frac{1,0}{0-3}$	30	–	–	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	–	–	$\frac{1,0}{0-3}$	30

Примечание: «–» – отсутствие вида в пробе, * – медиана, ** – межквартильный размах.

Анализ данных показал, что количественные показатели микроорганизмов варьируют от 10^2 до 10^8 микробных клеток в 1 мл и зависят от места отбора проб. Индекс встречаемости для разных видов бактерий составляет от 30 до 100%. Во всех пробах присутствуют бактерии рода *Rheinheimera*.

На водонесущих конструкциях береговых насосных станций энергоблоков № 3 и № 4 образуются биопленки, основу которых составляют бактерии *Rheinheimera* и *Bacillus*. Пробы бактериообрастаний с оборудования береговой насосной станции энергоблока № 3 включают 5 видов бактерий, численность отдельных ви-



дов варьирует от 10^2 до 10^7 микробных клеток в 1 мл, индекс встречаемости достигает 100%. Биопленки с конструкций береговой насосной станции энергоблока № 4 менее разнообразны (3 вида), численность бактерий не превышает 10^3 микробных клеток в 1 мл.

На конструкциях машинных залов энергоблоков № 3 и № 4 обнаружено 5 видов бактерий 4 родов. Из проб биопленок, образуемых на оборудовании машинного зала энергоблока № 3, чаще изолировались бактерии *Rheinheimera chironomi* (100%), *Aeromonas* sp. (70%) и *Bacillus halotolerans* (70%). Численность указанных видов также была максимальной и достигала 10^7 микробных клеток в 1 мл, что позволяет говорить о доминировании бактерий родов *Rheinheimera*, *Aeromonas* и *Bacillus* в биопленках. Пробы, отобранные на конструкциях машинного зала энергоблока № 4, отличались меньшим видовым разнообразием (3 вида, 2 рода), низкими показателями численности (до 10^3 микробных клеток в 1 мл) и встречаемости (до 30%).

Сравнительный анализ состава биопленок, образуемых на водонесущих конструкциях береговых насосных станций и машинных залов, показал, что индекс общности видового состава достигает 67%. Это связано с передачей воды береговыми насосными станциями из водоема-охладителя в машинные залы.

На оборудовании насосной станции подпитки пруда-охладителя обнаружено 4 вида бактерий, доминантами по встречаемости (до 70%) и численности (до 10^8 микробных клеток в 1 мл) также являются *Rheinheimera* и *Bacillus*. НППО закачивает воду из устьевой части р. Березовка в водоем-охладитель.

Биопленки конструкций резервного дизель-генератора 3-го энергоблока имеют максимальное биоразнообразие (7 видов бактерий). По индексу встречаемости и численным показателям доминируют бактерии родов *Rheinheimera*, *Aeromonas* и *Bacillus*. Вода, находящаяся в агрегатах РДЭС, поступает из замкнутых брызгальных бассейнов, отделенных от естественных водоемов, что является причиной высокого биоразнообразия микроорганизмов.

Во всех пробах обнаружены хемолитотрофные бактерии из группы железобактерий, находящиеся в ассоциации и образующие основу биопленки.

Таким образом, на металлических конструкциях в системе технического водоснабжения Балаковской АЭС формируются микробные биопленки, в составе которых обнаружены сапрофитные хемоорганотрофные мезофильные аэроб-

ные и факультативно-анаэробные бактерии 8 видов, а также хемолитотрофные железобактерии, образующие основу биопленки. Количественные показатели изолированных из биопленки видов варьируют от 10^2 до 10^8 микробных клеток в 1 мл. Индекс встречаемости доминантных видов достигает 100%.

Выделенные микроорганизмы представлены широко распространенными в природных водных и почвенных экологических системах видами бактерий, однако некоторые виды изолированных родов бактерий являются условно-патогенными и могут вызывать инфекционные заболевания у человека и животных [3, 4]. Обнаружение их в водоемах и системах водоснабжения может быть связано с благоприятными для сохранения и размножения условиями, в первую очередь значениями температурного фактора.

Список литературы

1. Селезнева А. В., Селезнев В. А. Проблемы восстановления экологического состояния водных объектов // Водное хозяйство России. 2010. № 2. С. 28–44.
2. Шалапин С. Н., Шалапина Т. С. Борьба с биологическими обрастаниями в системах оборотного водоснабжения и открытых водоемов. URL: <http://ukrengineer.com/pdf/bio.pdf> (дата обращения: 15.04.2018).
3. Нетрусов А. И. Экология микроорганизмов. М. : Академия, 2004. 265 с.
4. Наливайко Н. Г. Микробиология воды. Томск : Изд-во Том. политехн. ун-та, 2006. 139 с.
5. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Б. Л. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. А. И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
6. Андрианов А. П., Первов А. Г. Методика определения параметров эксплуатации ультрафильтрационных систем очистки природных вод // Критические технологии. Мембраны. 2003. № 2 (18). С. 3–22.

Bacteria Fouling in the Systems of Technical and Circulating Water Supply of Balakovo Nuclear Power Station

A. V. Kirilova, E. V. Glinskaya,
M. Yu. Voronin, A. S. Saveleva

Anna V. Kirilova, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., 410012, Saratov, Russia, anna.kirilova2017@yandex.ru

Elena V. Glinskaya, <https://orcid.org/0000-0002-1675-5438>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., 410012, Saratov, Russia, elenavg-2007@yandex.ru

Maksim Yu. Voronin, <https://orcid.org/0000-0001-7992-4502>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., 410012, Saratov, Russia, voroninmj@yandex.ru



Alexandra S. Saveleva, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., 410012, Saratov, Russia, saveleva.sasha13@mail.ru

The article is devoted to the study of bacteria in the system of technical water supply of Balakovo nuclear power plant (BNPP). The work was carried out in 2017. The samples were taken at the following sites: backup diesel generator of the 3rd unit (røde's-3), pumping station of feeding pond-cooler (PSFPC), coastal pump station of unit 3 (CPS-U3), coastal pumping station of power unit № 4 (CPSP-U4), turbine hall of power unit № 3 (TH-PU3), turbine hall of power unit № 4 (TH-PU4). The results showed that the metal structures (BNPP) formed a microbiological film, in which were found saprophytic chemoorganotrophic mesophilic aerobic and facultative-anaerobic

bacteria of 5 genera (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Rheinheimera*, *Vibrio*) as well as chemolithotrophic bacteria from the group of iron bacteria being in the association. The quantitative indices of species isolated from biofilm ranged from 10^2 to 10^8 microbial cells in 1 ml. The isolated microorganisms are represented by species of bacteria widespread in natural water and soil ecological systems, however some species of isolated genera of bacteria are opportunistic bacteria and can excite stimulate infectious diseases in humans and animals. The bacteria detection in water biotopes might be associated with temperature values that are favourable for their growth.

Key words: bacteria fouling, technical and circulating water supply, Balakovo NPP, saprophytic bacteria, iron bacteria, opportunistic bacteria.

Образец для цитирования:

Кирилова А. В., Глинская Е. В., Воронин М. Ю., Савельева А. С. Бактериообрастания в системе технического водоснабжения Балаковской атомной электростанции // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 451–454. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-451-454>

Cite this article as:

Kirilova A. V., Glinskaya E. V., Voronin M. Yu., Saveleva A. S. Bacteria Fouling in the Systems of Technical and Circulating Water Supply of Balakovo Nuclear Power Station. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 451–454 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-451-454>



УДК 577.32:573.6.086.83:577.114.4/8

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ СВОЙСТВ АЛЬГИНАТА, СИНТЕЗИРОВАННОГО ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *AZOTOBACTER VINELANDII* Д-05



В. В. Шутова, А. Б. Русяева

Шутова Виталина Викторовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва, Саранск, vshutova@yandex.ru

Русяева Анна Бозорбоевна, магистрант, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва, Саранск, 39anchiklobaski@mail.ru

Бактериальные альгинаты находят широкое применение в биомедицине в качестве носителей при иммобилизации клеток, ферментов, лекарств. Их функциональные свойства зависят от их мономерного состава и молекулярной массы и варьируют в зависимости от источника и условий культивирования. Установлено, что в качестве эффективного и дешевого источника питания для роста бактерии *Azotobacter vinelandii* штамм Д-05 и получения альгината можно использовать мелассу (отход свеклосахарного производства). Предложено использовать глубинное периодическое культивирование продуцента на средах различного состава. Изучение свойств альгината проводилось методами ИК-спектроскопии с использованием инфракрасного анализатора фурье-спектрометра Shimadzu IRPrestige-21, а также ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC-20 Prominence. При культивировании *A. vinelandii* на средах с мелассой оптимальной концентрацией субстрата для накопления полисахарида является 5% (по сахарозе). С помощью ИК-спектроскопии доказана идентичность полисахарида, выделенного из культуральной жидкости альгинату, который включает несколько субфракций с молекулярной массой от 3 до 350 кДа, причем максимальная доля приходится на фракцию с молекулярной массой 300 кДа. **Ключевые слова:** экзополисахарид, глубинное культивирование, меласса, альгинат, *Azotobacter vinelandii*.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-455-461>

Введение

В настоящее время большое внимание уделяется эффективному использованию вторичных ресурсов биотехнологических производств. Отходом свеклосахарного производства является меласса – сиропобразная жидкость тёмно-бурого цвета со специфическим запахом, содержащая большое количество углеводов (главным образом сахарозы), которые являются главными источниками для питания бактерий – продуцентов полисахаридов [1, 2]. Одним из таких полисахаридов является альгинат. Известно, что альгинаты представляют собой гетерополисахариды (из β -D-маннуроносовой (М) и α -L-гулууроносовой кис-

лоты (G), связанных 1,4-гликозидными связями), которые формируют либо гомополимерные блоки М, либо гетерополимерные блоки М и G, чередуясь случайным образом [3]. Бактериальные альгинаты отличаются от альгината из водорослей наличием О-ацетилированных маннуроносовых остатков по C₂ и C₃ атомам М звеньев и отсутствием GG-звеньев; большинство этих остатков являются моно-О-ацетилированными, но среди них имеются 2,3-О-ацетилированные. Кроме того, бактериальные альгинаты обычно характеризуются более высокой молекулярной массой: молекулярная масса альгинатов различных штаммов *A. vinelandii* варьирует в пределах от 340 000 до 4 000 000 кДа [4–6]. Отметим, что некоторые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* могут синтезировать большое количество альгинатов, достаточное для формирования высокоструктурированных биопленок [7], тогда как *A. vinelandii* синтезирует полимер с высокой долей остатков G, которые связаны с клеткой и формируют цисты, устойчивые к обезвоживанию [6]. Из-за патогенной природы *P. aeruginosa* в получении данного полисахарида наибольшее применение нашли бактерии *A. vinelandii* [7].

Отметим, что *A. vinelandii* синтезирует два полимера, используемые в производстве: внутриклеточный (поли- β -гидроксипропанат (ПГБ)) и внеклеточный альгинат, функциональные свойства которых зависят от состава и молекулярной массы. Предполагается, что внеклеточный альгинат формирует барьер для проникновения кислорода или тяжелых металлов [8]. Также есть штамм, который может образовывать полисахарид леван, в том числе на средах с мелассой [9, 10]. Для получения полисахаридов применяется как периодическое, так и непрерывное культивирование бактерий *A. vinelandii* [11, 12], причем большое значение имеет регуляция аэрации [13, 14].

Функциональные свойства альгинатов зависят от их мономерного состава и молекулярной массы и варьируют в зависимости от источника их получения. Альгинаты используют для регуляции вязкости (желирующий агент для пищевой промышленности), в качестве клеящих или сор-



бирующей краску веществ (в бумажной и текстильной промышленности). Из нерастворимых альгинатов получают волокна и относительно негорючие маслостойкие пленки. Уникальные свойства альгинатов, а также очевидная биологическая совместимость позволяют рекомендовать их для использования в медицине в качестве повязки на рану или матрицы для образования ткани [15, 16].

В настоящее время особое внимание уделяется разработке технологии иммобилизации биологически активных веществ путем химической коацервации в оболочки из природных полиэлектролитов. С помощью ионной сшивки мультивалентных катион- и анионсодержащих полиэлектролитов (в частности, таких полисахаридов, как хитозан и альгинаты) формируются гелевые микросферы, внутри которых могут быть локализованы фармакологические препараты, бактерии, факторы роста, ткани животных, косметические, парфюмерные и пищевые материалы. Важно, что микросферы можно производить из альгината в присутствии ионов кальция и они обладают пролонгированным действием и низкой токсичностью в течение длительного периода времени [17].

Цель настоящего исследования заключалась в получении, выделении и очистке бактериального альгината на средах с мелассой, а также изучении его свойств методами ИК-спектроскопии и ВЭЖХ.

Материалы и методы

Объектом исследования служила культура штамма бактерии *A. vinelandii* D-05 (ВКПМ), которую выращивали в течение 3 суток при 28°C на агаризованной среде Эшби (среда А, г/л): маннит – 20; K_2HPO_4 – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $FeSO_4$ – 0,1; $CaCO_3$ – 5; агар-агар – 20. Для получения инокулята использовали жидкую сахаросодержащую среду (среда Б, г/л): сахароза – 20; KH_2PO_4 – 0.011; Na_2HPO_4 – 0.189; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2; $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ – 0.02; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.006; MoO_3 – 0.00005; NaCl – 0.01; $NaHCO_3$ – 0.05. Культивирование бактерий *A. vinelandii* осуществляли в шейкере 2 суток при 250 об/мин и температуре 28°C. В эксперименте инокулятом (10%) засеивали мелассные среды (1–10% по сахарозе) и среду Б с измененным содержанием сахарозы (4 и 5%) и культивировали в течение 72 ч в тех же условиях, что и инокулят.

Для определения биомассы использовали весовой метод. Отделение клеток микроорганизма от среды культивирования проводили с помощью центрифугирования (при 7000 г 45 мин). Осадок

промывали дистиллированной водой и высушивали при 102–105°C. Содержание альгината в среде культивирования контролировали, осаждая полисахарид из 5 мл культуральной жидкости, освобожденной от клеток, изопропиловым спиртом в соотношении 1:2. Осадок высушивали при 105±2 °С до постоянной массы. Для регистрации содержания полисахарида в культуральной жидкости образец центрифугировали (18000 об/мин, 4°C в течение 30 мин), проводили двухкратное осаждение изопропиловым спиртом и лиофилизировали (при – 50 °С в течение 24 ч с помощью лиофильной сушилки модель FreeZone Plus (Labconco, США)).

Молекулярную структуру полисахарида исследовали с помощью ИК-фурье-спектрометра Shimadzu IRPrestige-21 (Япония), а молекулярный вес определяли с помощью жидкостного хроматографа Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с колонкой SupelcoGel LC-NH2 (США) [18]. Скорость подачи растворителя варьировала в диапазоне 0.4 мл/мин, температура колонки – 27°C. В качестве стандартов использовали растворы декстранов с известной молекулярной массой: 12, 25, 80, 270 кДа.

Результаты и их обсуждение

Известно, что азотобактер является полифагом, который в качестве источника углерода использует моно-, ди- и полисахариды, органические кислоты жирного и ароматического ряда, летучие органические соединения (пары этилового спирта, ацетона) [19]. Важно, что *A. vinelandii* штамм D-08 может синтезировать экзополисахарид леван на средах с мелассой [20], есть исследования по культивированию других штаммов на мелассных средах [21]. Значение pH важно для культивирования микроорганизмов, поскольку определяет метаболизм клеток и активное состояние ферментов.

В связи с этим мы исследовали зависимость интенсивности роста *A. vinelandii* и биосинтеза альгината от содержания сахарозы в мелассной среде. В этих экспериментах культивирование бактерии проводили как в средах с 1–10% мелассы (по сахарозе), так и в жидкой сахаросодержащей среде с 4 и 5% сахарозы. Исходное значение pH питательных сред составляло pH 6.8–7.2. Установлено, что при культивировании бактерии в средах, содержащих от 1 до 5% (по сахарозе) мелассы, pH снижается в 1 сутки, а в средах, содержащих от 5 до 10% мелассы, к 1-м суткам отмечено незначительное увеличение pH (рис. 1, а). Контролем служили данные исследования изменений pH при культивировании



бактерии на питательных средах, содержащих 4 и 5% сахарозы. Установлено, что в среде с 4% сахарозы pH уменьшается в течение 2 суток, а в среде с 5% сахарозы – в течение одних суток (см. рис. 1, б). Таким образом, максимальные изменения pH при культивировании бактерии происходят в средах, содержащих 1–4% мелассы.

Установлено, что при добавлении 1 и 2% мелассы накопление альгината к 3-м суткам

было незначительным, при увеличении содержания мелассы до 3 % выход экзополисахарида возрастал до 2,7 г/л (рис. 2, а). Отметим, что в среде с 4 и 5% мелассы наблюдали самое высокое накопление альгината (до 15 г/л). На средах с сахарозой количество экзополисахарида также возрастало при культивировании до 3 суток и составило около 16 г/л в обоих вариантах, что на 6,3% выше, чем на мелассной среде (рис. 2, б).

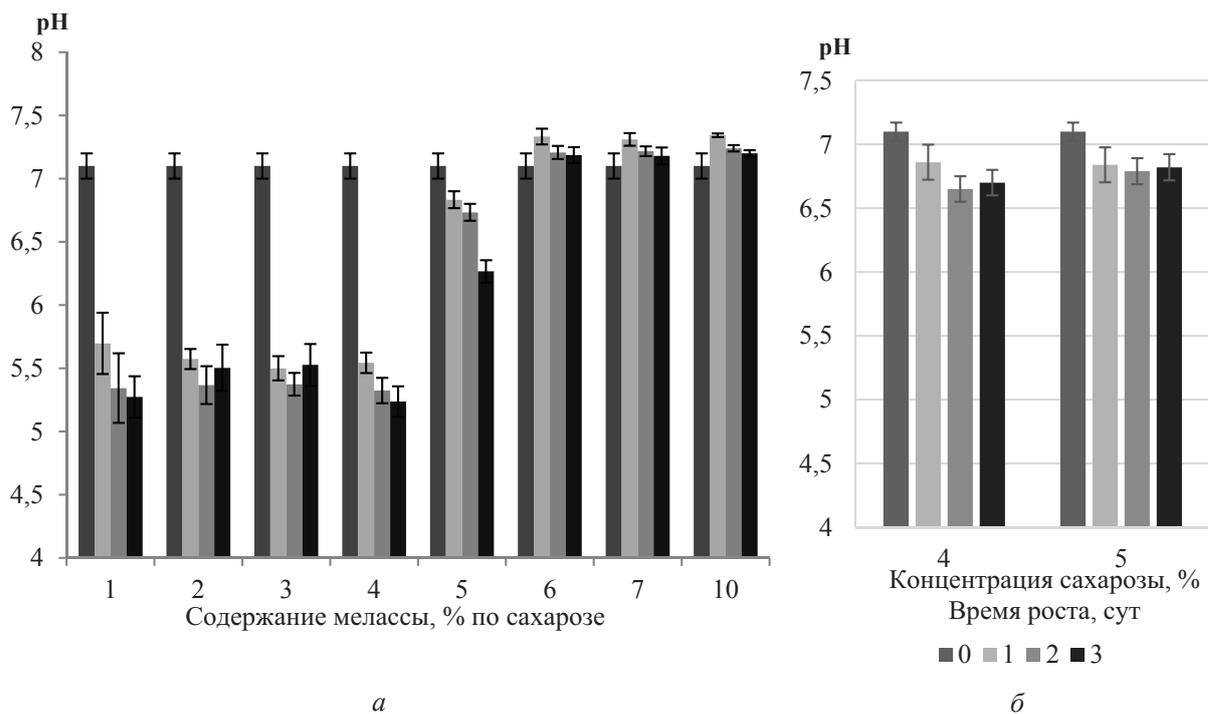


Рис. 1. Динамика pH среды при культивировании бактерии *A. vinelandii* на средах: а – с мелассой, б – сахарозой

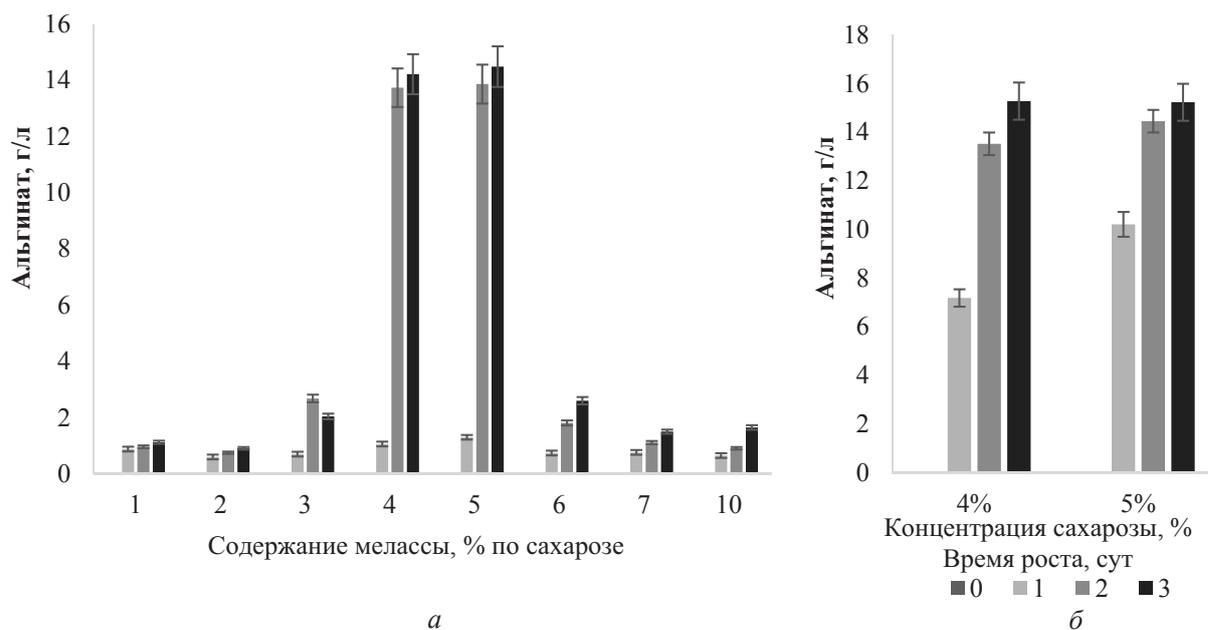


Рис. 2. Динамика содержания альгината при культивировании *A. vinelandii* на средах: а – с мелассой, б – сахарозой



Итак, в ходе проведенного исследования установлено, что мелассу можно использовать для культивирования продуцентов альгината наряду с сахарозосодержащими средами. Для оптимального функционирования микроорганизма и синтеза полисахарида в мелассе содержится достаточно питательных веществ и субстрата. Резкое снижение выхода альгината при культивировании бактерий в средах с высоким содержанием мелассы обусловлено, вероятно, присутствием ингибиторов роста или субстратным ингибированием ферментов клеток. Это, прежде всего, продукты превращения формалина, меланоидины и карамели, они могут осаждаться на поверхности бактериальной клетки и снижать проницаемость клеточной стенки [22].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при изменении содержания мелассы от 1 до 3% наблюдался существенный рост внеклеточного белка: максимальное содержание (90 мкг/мл) выявлено при 3% мелассы, а при повышении ее содержания обнаружено снижение показателя, но значения оставались достаточно высокими. При культивировании в средах с сахарозой наблюдалось более высокое содержание белка (150 мкг/мл), причем на средах с содержанием сахарозы 4 и 5% значения отличались незначительно.

Также исследовали динамику роста бактерий в жидких питательных средах с мелассой и сахарозой. Показано, что в течение 3 суток культивирования штамма на среде с 1–5% мелассы

содержание биомассы росло. Максимальное содержание биомассы выявлено при культивировании *A. vinelandii* на среде с 4% (2,1 г/л), что выше, чем при 5% мелассы (1,87 г/л), хотя именно на этой среде культура показывала высокий выход полисахарида (рис. 3, а). При культивировании на 4% и 5% сахарозной среде в обоих случаях также наблюдался рост биомассы к 3-м суткам, а максимальное количество составило 2,3 г/л (рис. 3, б). Таким образом, наибольший рост биомассы отмечен на 4% меласной среде по сахарозе, однако на сахарозной среде количество биомассы было больше. При биосинтезе альгината микроорганизмами высокий выход полимера достигается при ограничении роста культуры лимитирующими факторами, например, источниками азота и углерода [23]. Известно, что для роста бактерий *A. vinelandii* необходимы такие компоненты, как углеводы, спирты, органические кислоты, минеральные элементы в виде фосфорных и кальциевых солей [19]. Используемая нами меласса содержит вещества, необходимые как для роста микроорганизма, так и для образования и накопления полисахарида альгината. В результате исследований мы выяснили, что в меласной среде лучшей концентрацией сахарозы для накопления альгината является 5%.

В следующих экспериментах из культуральной жидкости, полученной на среде с 5% мелассы, был выделен полисахарид, было проведено изучение его фракционного состава и ИК-

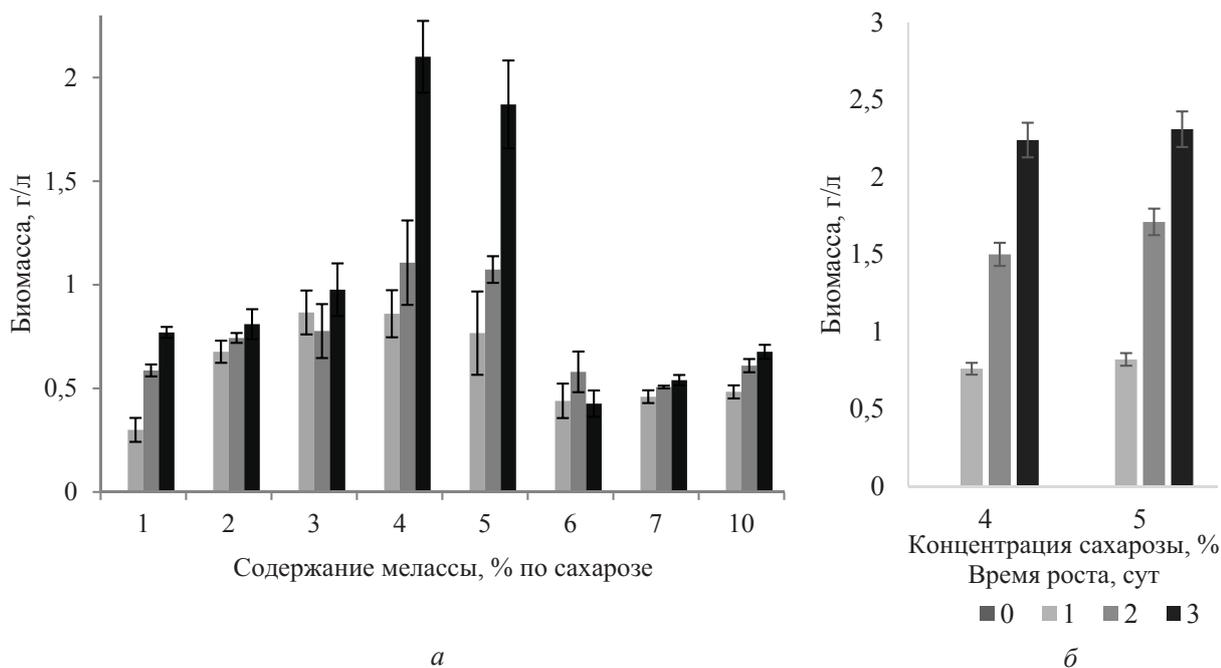


Рис. 3. Динамика изменения биомассы при культивировании бактерии в средах: а – с мелассой, б – сахарозой



спектроскопия. ИК-спектры альгината (рис. 4), характеризуются колебаниями следующих молекулярных связей: 3400 см^{-1} – групповые валентные колебания $-\text{OH}$, $2900\text{--}2950\text{ см}^{-1}$ – групповые валентные колебания $-\text{CH}_2$, 2400 см^{-1} – колебания $-\text{COOH}$, 1800 и 1730 см^{-1} – область колебаний двойных связей ($-\text{C}=\text{O}$), 1607 см^{-1} – колебания $-\text{COO}^-$, 1320 см^{-1} – скелетные колебания маннуроновой кислоты, 1100 и 900 см^{-1} – скелетные колебания $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$, 600 см^{-1} – деформационные колебания углерода. Полоса 1290 см^{-1} , которая обусловлена колебаниями гулууроновой кислоты, выражена в виде плеча. Поскольку в ИК-спектре максимум пика полосы поглощения из области 1630 см^{-1} (COO^-) смещается в область 1730 см^{-1}

(COOH), можно заключить, что альгинат находится в неионизированной форме альгиновой кислоты [24–29].

С помощью ВЭЖХ-хроматографии (рис. 5) нами был определен фракционный состав альгината (таблица).

Относительная доля фракций альгината

Молекулярная масса, кДа	Относительная доля, %
3	15,8
6	4,3
10	2,2
25	29,6
290	7,9
300	37,8
350	2,5

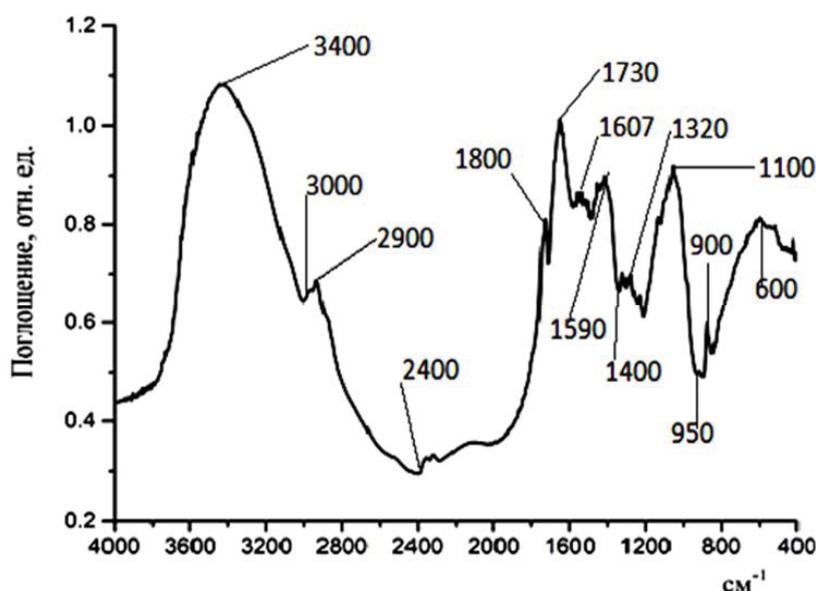


Рис. 4. ИК-спектр альгината *A. vinelandii* D-08

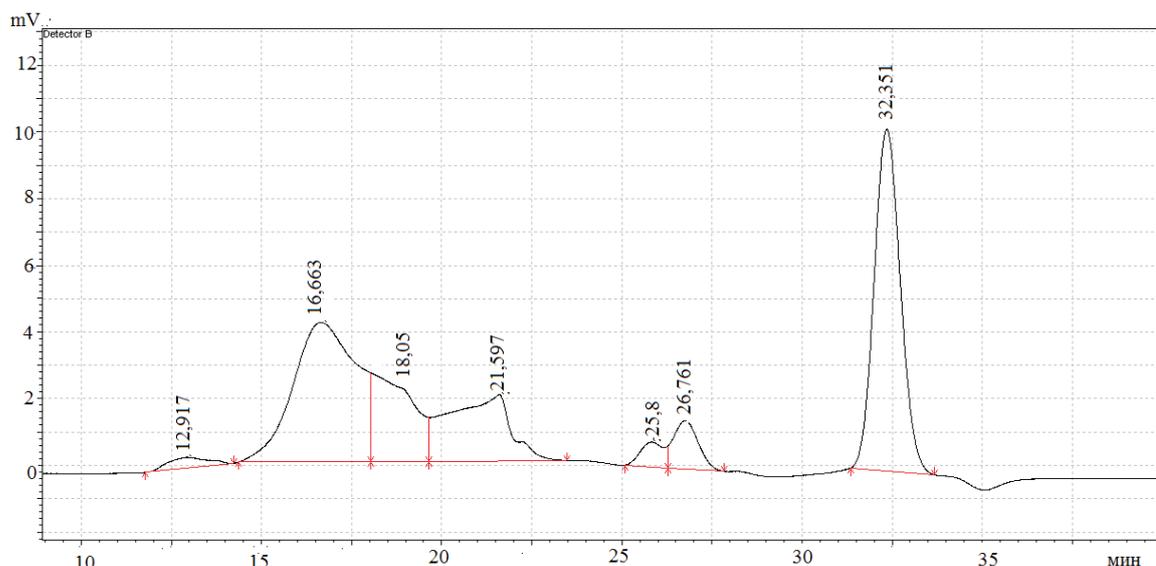


Рис. 5. ВЭЖХ хроматограмма фракций альгината *A. vinelandii* D-08



Максимальная доля фракций альгината приходится на молекулярные массы 3 кДа, 25 кДа и 300 кДа и составляет 15,8%, 29,6% и 37,8% соответственно. Известно, что для альгината *A. vinelandii*, полученного при культивировании на сахаросодержащей среде, характерны высокомолекулярные (300, 270, 100 и 50 кДа) [30] и низкомолекулярные фракции (3, 6 и 10 кДа) [8].

Итак, в ходе исследования был выделен альгинат, синтезированный при культивировании *A. vinelandii* на меласной среде и исследованы его молекулярные свойства. Установлено, что для синтеза альгината (с молекулярной массой 300 кДа) необходимо использовать среду культивирования с 5% мелассы (по сахарозе).

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-05054/18).

Список литературы

1. Шутова В. В., Ведякина Т. А., Ивинкина Т. И., Ревин В. В. Получение клеевых составов и материалов при использовании культуральной жидкости полисахаридсинтезирующих микроорганизмов // Изв. вузов. Сер. Строительство. 2010. № 3. С. 31–36.
2. Шутова В. В., Ревин В. В. Химическая модификация декстрансодержащей культуральной жидкости для получения адгезивов // Актуальная биотехнология. 2014. № 3 (10). С. 118–119.
3. Donati I., Paoletti S. Material properties of alginates // Alginates : Biology and Applications / ed. B. H. A. Rehm. Berlin ; Heidelberg : Springer Verlag, 2009. P. 1–53.
4. Ревин В. В., Атыкян Н. А., Водяков В. Н., Ляськова Е. В., Кадималиев Д. А., Шутова В. В. Общая биотехнология. Саранск : Изд-во Морд. ун-та, 2015. 604 с.
5. Nivens D. E., Ohman D. E., Williams J., Franklin M. J. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183, № 17. P. 1045–1057.
6. Sabra W., Zeng A.P. Microbial production of alginates : physiology and process aspects // Alginates : Biology and Applications / ed. B. H. A. Rehm. Berlin ; Heidelberg : Springer Verlag, 2009. P. 153–173.
7. Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D., Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* // Microbial Cell Factories. 2007. Vol. 6, № 1. P. 7.
8. Peña C., Campos N., Galindo E. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks // Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1997. Vol. 48, № 4. P. 211–223.
9. Revin V. V., Shutova V. V., Novokuptsev N. V. Biocomposite materials from lignocellulose raw materials and levan produced by *Azotobacter vinelandii* // J. of Biotechnol. 2016. Vol. 231. Supplement. P. S8.
10. Ревин В. В., Шутова В. В., Новокупцев Н. В. Биоконпозиционные материалы на основе ультрадисперсных частиц древесины и левана, полученного путем микробного биосинтеза *Azotobacter vinelandii* Д-08 // Фундаментальные исследования. 2016. № 1. С. 53–57.
11. Mejía M. A., Segura D., Espín G., Galindo E., Peña C. Two-stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis // J. Appl. Microbiol. 2010. Vol. 108, № 1. P. 55–61.
12. Flores C., Díaz-Barrera A., Martínez F., Galindo E., Peña C. Role of oxygen in the polymerization and depolymerization of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* // J. of Chem. Technol. and Biotechnol. 2015. Vol. 90, № 3. P. 356–365.
13. Díaz-Barrera A., Martínez F., Pezoa F. G., Acevedo F. Evaluation of gene expression and alginate production in response to oxygen transfer in continuous culture of *Azotobacter vinelandii* // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 8. P. e105993.
14. Díaz-Barrera A., Silva P., Berrios J., Acevedo F. Manipulating the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous culture // Bioresour Technol. 2010. Vol. 101, № 23. P. 9405–9408.
15. Christensen B. E. Alginates as biomaterials in tissue engineering // Carbohydrate Chemistry : Chem. and Biol. Appr. 2011. Vol. 37. P. 227–258.
16. Díaz-Barrera A., Soto E. Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii* : Current state, limits and prospects // Afr. J. Biotechnol. 2010. Vol. 9, № 33. P. 5240–5250.
17. Microbial production of biopolymers and polymer precursors : applications and perspectives / ed. B. H. A. Rehm. Norfolk, UK : Caister Acad. Press, 2009. 293 p.
18. Díaz-Barrera A., Silva P., Avalos R., Acevedo F. Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O₂ transfer rate in chemostat cultures // Biotechnol. Lett. 2009. Vol. 31, № 6. P. 825–829.
19. Díaz-Barrera A., Gutierrez J., Martínez F., Altamirano C. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions // Bioprocess Biosyst. Eng. 2014. Vol. 37, № 6. P. 1133–1140.
20. Шутова В. В., Котина Е. А. Использование мелассы в средах для культивирования левансинтезирующего штамма *Azotobacter vinelandii* // Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке : сб. ст. Саранск : ООО «Референт», 2015. С. 54–57.
21. Логинов Я. О., Худайгулов Г. Г., Четвериков С. П., Мелентьев А. И., Логинов О. Н. Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гулурановой кислоты // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 3. С. 343–347.



22. Огурцов А. Н. Молекулярная биотехнология микробиологических систем : учеб. пособие. Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. 142 с.
23. Savalgi V., Savalgi V. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in batch culture // J. of Gen. and Appl. Microbiol. 1992. Vol. 38, № 6. P. 641–645.
24. Larkin P. J. Infrared and Raman spectroscopy : principles and spectral interpretation. Waltham ; Elsevier, 2011. 230 p.
25. Chanda N. P., Matsuhiro B., Vásquez A. E. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy // Carbohyd. Polym. 2001. Vol. 46, № 1. P. 81–87.
26. Leal D., Matsuhiro B., Rossi M., Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds // Carbohydr. Res. 2008. Vol. 343, № 2. P. 308–316.
27. Liu Y., Zhao X. R., Peng Y. L., Wang D., Yang L., Peng H., Wang D. Y. Effect of reactive time on flame retardancy and thermal degradation behavior of bio-based zinc alginate film // Polymer Degradation and Stability. 2016. Vol. 127. P. 20–31.
28. Subramanian V., Ganapathi K., Dakshinamoorthy B. FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR Spectroscopy of alginate extracted from *turbinaria decurrens* (Phaeophyta) // World J. of Pharm. and Pharm. Sci. 2015. Vol. 4, № 12. P. 761–771.
29. Tian G., Ji Q., Xu D., Tan L., Quan F., Xia Y. The effect of zinc ion content on flame retardance and thermal degradation of alginate fibers // Fiber Polym. 2013. Vol. 14, № 5. P. 767–771.
30. Pena C., Miranda L., Segura D., Nunez C., Espin G., Galindo E. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants // J. of Industrial Microbiol. and Biotechnol. 2002. Vol. 29, № 5. P. 209–213.

Preparation and Identification of the Molecular Properties of Alginate Synthesized by the Cultivation of *Azotobacter vinelandii* D-05

V. V. Shutova, A. B. Rusyaeva

Vitalina V. Shutova, <https://orcid.org/0000-0001-6437-3621>, Ogarev Mordovia State University, 68, Bolshevistskaya Str., Saransk, 430005, Russia, vshutova@yandex.ru

Anna B. Rusyaeva, Ogarev Mordovia State University, 68, Bolshevistskaya Str., Saransk, 430005, Russia, 39anchiklobaski@mail.ru

It is known that bacterial alginates are widely used in biomedicine as carriers in the immobilization of cells, enzymes and drugs. Their functional properties depend on their monomeric composition and molecular weight and vary depending on the source and the cultivation conditions. It was established that molasses (waste of sugar beet production) can be used as an effective and cheap source of nutrition for the growth of the bacterium *Azotobacter vinelandii* strain D-05 and the production of alginate. Submerged periodic cultivation of the producer on media of different composition was used. The properties of the alginate were controlled by IR spectroscopy. It was shown, that during *A. vinelandii* cultivation on molasses media, the best substrate concentration for the polysaccharide synthesis is 5% (by sucrose). The IR spectrum of the polysaccharide isolated from the culture liquid and purified alginate was similar. The alginate consists of several fractions with a different molecular weight the largest having a molecular mass of 300 kD.

Key words: exopolysaccharide, submerged cultivation, molasses, alginate, *Azotobacter vinelandii*.

Acknowledgements: *This work was supported by the Russian Foundation for Basic Researches (project no. 18-29-05054\18).*

Образец для цитирования:

Шутова В. В., Русяева А. Б. Получение и оценка молекулярных свойств альгината, синтезированного при культивировании *Azotobacter vinelandii* Д-05 // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 455–461. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-455-461>

Cite this article as:

Shutova V. V., Rusyaeva A. B. Preparation and Identification of the Molecular Properties of Alginate Synthesized by the Cultivation of *Azotobacter vinelandii* D-05. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 455–461 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-455-461>



УДК 582.475:581.33:631.529(477.75)

БИОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АЭРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН СЕВЕРОАМЕРИКАНСКИХ СОСЕН В УСЛОВИЯХ ЮЖНОГО БЕРЕГА КРЫМА



Ю. В. Плугатарь, Т. М. Сахно

Плугатарь Юрий Владимирович, член-корреспондент РАН, доктор сельскохозяйственных наук, Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Республика Крым, sahno_tanya@mail.ru

Сахно Татьяна Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории лесоведения, Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Республика Крым, sahno_tanya@mail.ru

Приведены результаты исследования биометрических характеристик и аэродинамических свойств пыльцы североамериканских видов: *Pinus radiata* D. Don, *Pinus sabiniana* Douglas, *Pinus coulteri* D. Don и автохтонного вида *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, произрастающих на Южном берегу Крыма (ЮБК). Выявлены различия размеров пыльцевых зерен и их отдельных параметров. Пыльца интродуцированных видов характеризуется большими размерами по сравнению с аборигенным. Для метрических показателей изучаемых параметров характерна низкая амплитуда изменчивости, что свойственно мужской генеративной сфере. Отмечено увеличение количества пыльцевых зерен с преобладанием высоты тела над его длиной у видов, которые менее засухоустойчивы в регионе проведения наблюдений. Несмотря на существенные различия размеров пыльцевых зерен исследуемых видов, они имеют одинаковый коэффициент парусности, что обеспечивает идентичные аэродинамические свойства пыльцы.

Ключевые слова: пыльца, интродукция, североамериканские виды, *Pinus radiata* D. Don, *Pinus sabiniana* Douglas, *Pinus coulteri* D. Don, морфометрия, парусность, Южный берег Крыма.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-462-468>

Изменчивость размеров пыльцевых зерен и их жизнеспособность определяется видовой принадлежностью [1] и генотипом, однако в значительной степени зависит от экологических факторов [2–6]. В настоящее время морфологические характеристики пыльцы представителей рода *Pinus* L. относят к наиболее информативным признакам, маркирующим устойчивость и состояние деревьев, позволяющим провести раннюю диагностику состояния растений, особенно в регионах, где складываются экстремальные для видов условия произрастания [7].

Размеры пыльцевых зерен относятся к показателям, имеющим наименьшую амплитуду изменчивости. У всех видов хвойных деревьев ко-

эффициент вариации различных признаков имеет близкую величину, что связано с наследственно закрепленной динамикой фенотипических показателей растения. Степень этой изменчивости, по-видимому, определяется генетической спецификой признака, что и обуславливает амплитуду его варьирования. Для большинства одноименных признаков характерен одинаковый порядок варьирования независимо от видовой принадлежности растения [8].

Параметры, характеризующие мужскую генеративную сферу сосны, подвержены очень сильным колебаниям по годам и тесно связаны с погодно-климатическими условиями в период формирования пыльцы [9]. Количественные и качественные характеристики пыльцевых зерен определяют репродуктивные возможности вида и служат важнейшими диагностическими признаками в эколого-генетических, селекционных и фитомониторинговых исследованиях [10–12]. Показатели морфологических характеристик пыльцы используются для изучения возможностей растений адаптироваться к динамическим и стрессовым условиям обитания, а также для оценки экологической пластичности и толерантности репродуктивных механизмов растений [7, 13–17]. В свою очередь, метрические показатели отдельных параметров пыльцевого зерна, а также их соотношение служат важнейшими критериями для оценки аэродинамических свойств пыльцы и способности к анемофильному опылению [18].

Пыльца представителей рода *Pinus* L. изучалась достаточно подробно, однако данные об особенностях морфометрических характеристик мужских генеративных структур у разных видов при интродукции немногочисленны. В связи с этим возникла необходимость провести исследование биометрических параметров пыльцевых зерен некоторых интродуцированных сосен Северной Америки и для сравнительной характеристики вида, естественно произрастающего в условиях проведения исследований.

Цель настоящей работы провести оценку биометрических характеристик пыльцевых зерен трех североамериканских видов сосны:



Pinus radiata D. Don, *Pinus sabiniana* Douglas, *Pinus coulteri* D. Don, произрастающих на Южном берегу Крыма (ЮБК) и автохтонного вида – *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe. Определить коэффициенты формы пыльцевых зерен и их аэродинамические свойства.

Материалы и методы

Модельные деревья изучаемых видов произрастают в нижнем поясе ЮБК на высоте до 300 м н.у.м. Большинство экземпляров сосредоточены в парках Никитского ботанического сада (Нижний, Верхний и Монтедор), а также парках Воронцовском, Приморском, Форосском и на территории МДЦ «Артек».

Объект исследования – свежесобранная пыльца североамериканских видов рода *Pinus* L.: *P. radiata*, *P. sabiniana*, *P. coulteri*, а также аборигенного вида *P. nigra* subsp. *pallasiana*.

По климатическим условиям район проведения исследований относится к сухим субтропикам. Жаркое сухое лето, относительно теплая зима [19]. Средняя годовая температура воздуха в нижнем поясе ЮБК убывает по мере продвижения на восток и колеблется от 13,5°C (Ай-Тодор) до 12,6°C (Алушта). Средняя температура зимнего периода +3,2°C, летнего +23,4°C. Абсолютный минимум, зафиксированный в феврале 1930 г., составил – 14,6°C, максимум в августе 1998 г. – +39°C. Среднегодовое количество осадков для данного района – 589 мм, большая их часть выпадает в осенне-зимний период [20].

Материал для изучения отбирали в период массового лета пыльцы с нижней трети кроны модельных деревьев в сухую, безветренную погоду. С использованием временных ацетокарминовых препаратов [21] изучали морфометрические параметры пыльцевых зерен по методике М. Х. Монозон-Смолиной [22]. Измеряли общую длину (L), длину (A) и высоту (B) тела пыльцевого зерна, длину (C) и высоту (D) летательного мешка у 750 пыльцевых зерен каждого вида, а также рассчитывали коэффициенты формы как отношение A/B , C/D , A/L , B/L . Парусность пыльцы определяли по формуле $(C+D)/(A+B)$. Для оценки степени варьирования признаков использовалась шкала С. А. Мамаева, где выделяются следующие уровни изменчивости: очень низкий ($V < 7\%$), низкий ($V = 8-12\%$), средний ($V = 13-20\%$), повышенный ($V = 21-30\%$), высокий ($V = 31-40\%$), очень высокий ($V > 40\%$) [23]. Исследование проводили с использованием микроскопа ЛОМО Микмед-5 и компьютерной программы MSview. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с

помощью программы Excel по общепринятым методикам в биометрии [24]. Характеристика погодных условий проводилась по данным агрометеостанции «Никитский сад».

Результаты и их обсуждение

Сроки полینации у исследуемых видов в погодных условиях 2017 г. существенно отличались. Наиболее ранний лет пыльцы, в начале второй декады апреля, отмечен у *P. radiata* при среднесуточной температуре воздуха +7,7°C и сумме положительных температур >5°C 455°C [25]. У аборигенного вида *P. nigra* subsp. *pallasiana* наступление фенофазы пыления проходило в начале первой декады мая при среднесуточной температуре +19,7°C и сумме положительных температур >5°C 683°C. У *P. sabiniana* лет пыльцы также проходил в начале первой декады мая при повышении среднесуточной температуры воздуха до +21,7°C и сумме положительных температур >5°C 703°C. Наиболее поздняя полінация, в конце второй декады мая, при сумме положительных температур >5°C 906°C и среднесуточной температуре воздуха +13,3°C наблюдалась у *P. coulteri*. В целом продолжительность рассеивания пыльцы исследуемых видов составляла 8–12 дней.

Изучение линейных параметров пыльцевых зерен позволило выявить существенные различия между их размерами у аборигенного вида и североамериканских (табл. 1).

Наибольшие размеры пыльцы были выявлены у *P. coulteri*. Среднее значение общей длины пыльцевого зерна с учетом воздушных мешков составляет $117,4 \pm 0,2$ мкм, амплитуда изменчивости от 98,5 до 142,3 мкм, при вариации 5,5%. Длина тела пыльцевого зерна колеблется от 58,8 до 102,2 мкм, среднее значение $77,9 \pm 0,2$ мкм ($V = 8,7\%$). Высота тела пыльцевого зерна находится в пределах 47,8–86,2 мкм, среднее значение $65,9 \pm 0,2$ мкм, варьирование показателя составило 9,3%. Характеристики летательных мешков имеют следующие значения: средняя длина $56,0 \pm 0,2$ мкм, предел изменчивости от 37,6–71,9 мкм ($V = 11,4\%$), средняя высота $42,2 \pm 0,2$ мкм, изменяется данный показатель от 28,8 до 63,2 мкм при коэффициенте вариации 12,2%.

Немного меньшие, по сравнению с предыдущим видом, отмечены параметры пыльцы у *P. radiata*. Среднее значение общей длины пыльцевого зерна составило $107,2 \pm 0,2$ мкм. Данный параметр изменяется от 90,7 до 125,9 мкм ($V = 5,1\%$). Длина тела пыльцы достигает $64,7 \pm 0,2$ мкм, при коэффициенте вариации 9,4%, высота тела – $58,2 \pm 0,1$ мкм, изменчивость – 6,8%. Среднее значение длины и



Таблица 1

Морфометрические параметры пыльцевых зерен

Вид		Параметры пыльцевых зерен, мкм				
		Общая длина пыльцевого зерна	Длина тела пыльцевого зерна	Высота тела пыльцевого зерна	Длина летательного мешка	Высота летательного мешка
<i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>	Lim	62,6–93,7	41,8–65,5	31,1–53,9	26,0–50,7	19,8–48,0
	$M \pm m$	80,7±0,2	52,7±0,1	43,7±0,1	39±0,2	29,1±0,1
	V, %	6,5	7,2	8,3	10,6	11,4
<i>P. radiata</i>	Lim	90,7–125,9	47,4–81,8	46,3–68,2	37,4–73,3	24,1–53,5
	$M \pm m$	107,2±0,2	64,7±0,2	58,2±0,1	55,2±0,2	36,5±0,2
	V, %	5,1	9,4	6,8	11,3	14,5
<i>P. sabiniana</i>	Lim	71,2–126,5	44,1–89,8	39,6–85,2	33,5–73,4	25,4–49,5
	$M \pm m$	104,6±0,3	68,0±0,2	61,5±0,3	56,5±0,2	38,0±0,2
	V, %	7,9	7,7	13,5	11,7	11,9
<i>P. coulteri</i>	Lim	98,5–142,3	58,8–102,2	47,8–86,2	37,6–71,9	28,8–63,2
	$M \pm m$	117,4±0,2	77,9±0,2	65,9±0,2	56,0±0,2	42,2±0,2
	V, %	5,5	8,7	9,3	11,4	12,2

Примечание. Lim – пределы изменчивости; M – среднее значение; m – стандартная ошибка среднего значения; V – коэффициент вариации. Различия средних величин по t -критерию Стьюдента достоверны на 1–2% уровне значимости.

высоты воздушных мешков $55,2 \pm 0,2$ мкм ($V = 11,7\%$) и $38,0 \pm 0,2$ мкм ($V = 11,9\%$) соответственно. В зарубежной литературе [26] приводятся минимальные показатели диаметра пыльцевых зерен для сосны лучистой в условиях Южной Африки, они находятся в пределах 34–59 мкм, среднее значение – 50 мкм. В наших условиях этот параметр характеризуется большими значениями и соответствует среднему показателю длины тела пыльцевого зерна 58,2 мкм, пределы изменчивости от 46,3–68,2 мкм.

Пыльца *P. sabiniana* характеризуется следующими параметрами: среднее значение длины пыльцевого зерна с учетом летательных мешков $104,6 \pm 0,3$ мкм ($V = 7,9\%$), длина тела пыльцевого зерна – $68,0 \pm 0,2$ мкм ($V = 7,7\%$), высота $61,5 \pm 0,3$ мкм ($V = 13,5\%$), длина воздушного мешка $56,5 \pm 0,2$ мкм ($V = 11,7\%$) и его высота $38,0 \pm 0,2$ мкм ($V = 11,9\%$).

В отличие от предыдущих североамериканских видов, пыльцевые зерна *P. nigra* subsp. *pallasiana* отличаются существенно меньшими размерами. Среднее значение показателя общей длины составило $80,7 \pm 0,2$ мкм, изменчивость признака 6,5%, длина тела пыльцевого зерна имеет средние показатели $52,7 \pm 0,1$ мкм

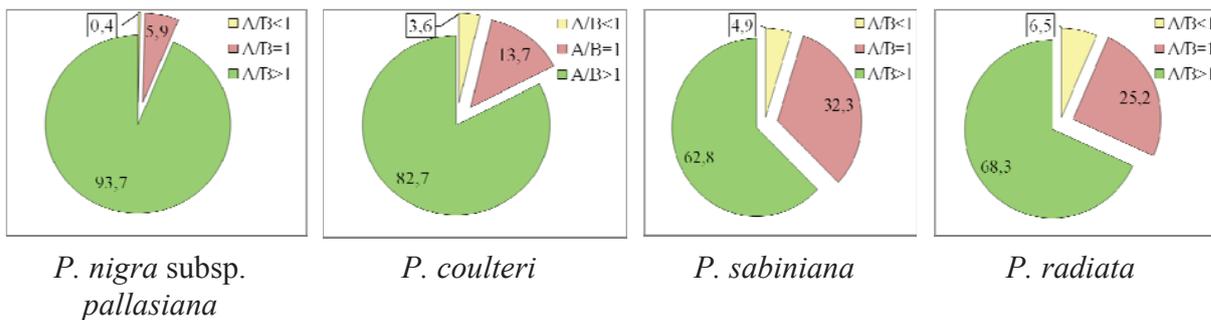
($V = 7,2\%$), высота тела $43,7 \pm 0,1$ ($V = 8,3\%$). Среднее значение длины и высоты воздушных мешков $39 \pm 0,2$ мкм ($V = 10,6\%$) и $29,1 \pm 0,1$ мкм ($V = 11,4\%$) соответственно.

С использованием шкалы С. А. Мамаева установлено, что отдельные параметры пыльцевых зерен исследуемых видов имеют очень низкий и низкий уровень изменчивости. Средний уровень варьирования наблюдался для параметров высоты тела пыльцевого зерна у *P. sabiniana* и высоты летательных мешков у *P. radiata*.

Для более подробной характеристики пыльцы часто используют показатели коэффициентов формы отдельных параметров пыльцевого зерна, которые определяются как отношение A/B , C/D , A/L , B/L .

Форма пыльцевого зерна (морфологический анализ) определялась по соотношению длины тела пыльцы (A) к его высоте (B). При этом было выделено 3 группы пыльцы по форме тела: $A/B > 1$, $A/B = 1$ и $A/B < 1$. Для исследуемых видов распределение формы тела пыльцевого зерна носит разный характер (рисунок).

И. Н. Третьякова (1990) описывает тенденцию увеличения высоты тела пыльцевого зерна для сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в экстре-



Распределение пыльцевых зерен по коэффициенту формы (A/B)

мальных условиях произрастания на северных и южных границах ее ареала [17]. Результаты наших исследований также показали заметное увеличение количества пыльцевых зерен с преобладанием высоты тела зерна у некоторых видов. Наименьшее количество морфологически измененных пыльцевых зерен наблюдалось у аборигенного вида *P. nigra subsp. pallasiana* – 0,4%, значительно большее было отмечено у интродуцентов: *P. coulteri* – 3,6, *P. sabiniana* – 4,9 и *P. radiata* – 6,5%. В регионе проведения наблюдений отмечена тенденция увеличения количества пыльцевых зерен с преобладанием высоты тела пыльцевого зерна у видов, которые менее засухоустойчивые.

Изучение корреляции выявило наличие некоторой зависимости отдельных параметров пыльцевых зерен. Для вида *P. sabiniana* положительная связь характерна для признаков $L-B$ ($r = 0,75$), $L-D$ ($r = 0,74$), $B-D$ ($r = 0,80$). Умеренная связь была отмечена у показателей $L-A$ ($r = 0,55$), $L-C$ ($r = 0,68$), $B-C$ ($r = 0,55$), $C-D$ ($r = 0,63$); у *P. coulteri* отмечена умеренная положительная связь между показателями $B-D$ ($r = 0,51$) и $C-D$ ($r = 0,56$); для аборигенного вида *P. nigra subsp. pallasiana* выявлена прямая умеренная связь между параметрами: $L-C$ ($r = 0,62$), $L-D$ ($r = 0,65$), $B-D$ ($r = 0,52$), $C-D$ ($r = 0,56$); у *P. radiata* умеренная положительная связь была отмечена только между параметрами длины и высоты воздушных мешков $B-D$ ($r = 0,66$).

В целом нами не выявлены определенные закономерности существования корреляции динамики отдельных параметров пыльцевых зерен у исследуемых видов, однако часто наблюдалась умеренная (и сильная у *P. sabiniana*) связь между значениями высоты тела пыльцевого зерна и высоты летательных мешков, а также длины и высоты воздушных мешков, за исключением последнего у *P. radiata*.

Соотношение высоты и длины тела пыльцевого зерна (A/B), как правило, наименее вариабельных признаков, характеризует не только

морфологические особенности тела пыльцевых зерен, но и парусность пыльцы (табл. 2). С приближением показателя к единице увеличивается летучесть пыльцевого зерна. Соотношение A/B имеет пониженное значение летательной способности у *P. nigra subsp. pallasiana* ($V = 10,8\%$) и у североамериканского вида *P. coulteri* ($V = 12,1\%$) при коэффициенте – 1,2. Для двух других видов *P. radiata* ($V = 10,8\%$) и *P. sabiniana* ($V = 11,7\%$) этот показатель составил 1,1.

Парусность воздушных мешков характеризует коэффициент формы C/D, чем он больше стремится к единице, тем более шаровидная форма летательных мешков и соответственно увеличивается летательная способность пыльцы.

У пыльцевых зерен изучаемых видов летательные мешки имеют вытянутую форму. Для *P. radiata* и *P. sabiniana* коэффициент равен 0,7 при коэффициенте вариации 10,8% и 11,7% соответственно. У *P. nigra subsp. pallasiana* и *P. coulteri* летательные мешки менее вытянутые, чем у предыдущих двух видов, соотношение C/D равно 0,8 ($V = 10,5-11,6\%$).

Чем выше A/L, тем слабее летучесть пыльцы, так как зерно занимает большую часть ее длины. Соотношение длины тела пыльцевого зерна к общей длине зерна для *P. sabiniana*, *P. coulteri* и *P. nigra subsp. pallasiana* составило 0,7. Несколько большей летучестью по данному признаку обладает *P. radiata*, у которой соотношение A/L равно 0,6.

Пыльца *P. nigra subsp. pallasiana* и *P. radiata* характеризуется большей летучестью за счет пониженного коэффициента B/L (0,5) по сравнению с *P. coulteri* и *P. sabiniana*, у которых этот показатель равен 0,6.

Перечисленные коэффициенты не в полной мере дают представления об аэродинамических особенностях пыльцы. Наиболее объективным показателем является коэффициент парусности пыльцы, с увеличением которого повышается летательная способность пыльцевых зерен.



Таблица 2

Коэффициенты формы и парусности пыльцевых зерен

Вид		Коэффициенты формы пыльцевых зерен				
		<i>A/B</i>	<i>C/D</i>	<i>A/L</i>	<i>B/L</i>	Парусность
<i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>	Lim, мкм	0,9–1,7	0,5–1,1	0,5–0,8	0,4–0,7	0,5–1,5
	$M \pm m$, мкм	1,2±0,0	0,8±0,0	0,7±0,0	0,5±0,0	0,7±0,0
	<i>V</i> , %	10,8	10,5	7,8	8,4	9,2
<i>P. radiata</i>	Lim, мкм	0,8–1,5	0,4–1,0	0,4–0,8	0,4–0,6	0,5–1,0
	$M \pm m$, мкм	1,1±0,0	0,7±0,0	0,6±0,0	0,5±0,0	0,7±0,0
	<i>V</i> , %	11,8	14,6	8,4	6,8	11,2
<i>P. sabiniana</i>	Lim, мкм	0,9–1,7	0,4–1,0	0,5–1,0	0,4–1,0	0,5–0,9
	$M \pm m$, мкм	1,1±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,6±0,0	0,7±0,0
	<i>V</i> , %	12,9	10,6	7,8	9,5	7,4
<i>P. coulteri</i>	Lim, мкм	0,8–1,7	0,5–1,5	0,5–0,8	0,4–0,7	0,5–0,9
	$M \pm m$, мкм	1,2±0,0	0,8±0,0	0,7±0,0	0,6±0,0	0,7±0,0
	<i>V</i> , %	12,1	11,6	8,2	9,4	10,6

Примечание. *A/B* – отношение длины тела пыльцевого зерна к его высоте; *C/D* – отношение длины летательного мешка к его высоте; *A/L* – отношение длины тела пыльцевого зерна к общей длине пыльцевого зерна; *B/L* – отношение высоты тела пыльцевого зерна к общей длине пыльцевого зерна; Lim – пределы изменчивости; *M* – среднее значение; *m* – стандартная ошибка среднего значения; *V* – коэффициент вариации.

Как показали результаты расчетов (см. табл. 2), у всех исследуемых видов, несмотря на существенные различия морфометрических характеристик пыльцевых зерен, а также их отдельных параметров, коэффициент парусности равен 0,7. Степень варьирования данного признака низкая, коэффициент вариации у *P. nigra* subsp. *pallasiana* 9,2, *P. coulteri* – 10,6, *P. sabiniana* – 7,4 и *P. radiata* – 11,2%.

Заключение

1. Изучение морфометрических параметров пыльцевых зерен выявило существенные различия между их размерами у аборигенного вида и североамериканских. Наибольшие размеры пыльцы были у *P. coulteri*, среднее значение общей длины пыльцевого зерна с учетом воздушных мешков составляет $117,4 \pm 0,2$ мкм. Этот показатель для *P. radiata* составил $107,2 \pm 0,2$, *P. sabiniana* – $104,6 \pm 0,3$ и наи-

меньшие размеры были у *P. nigra* subsp. *pallasiana* – $80,7 \pm 0,2$ мкм. Отдельные параметры пыльцевых зерен исследуемых видов характеризуются очень низким и низким уровнем изменчивости. Средний уровень варьирования наблюдался при оценке параметров высоты тела пыльцевого зерна у *P. sabiniana* и высоты летательных мешков у *P. radiata*.

2. При характеристике формы тела пыльцевого зерна в регионе проведения наблюдений, как соотношение *A/B*, отмечено увеличение количества пыльцевых зерен с преобладанием высоты тела пыльцевого зерна у видов, которые менее засухоустойчивые.

3. Аэродинамические свойства пыльцы исследуемых видов свидетельствуют об одинаковой дальности ее распространения, несмотря на различие ее размеров. Можно предположить, что размеры параметров пыльцевых зерен обусловлены генотипом, однако их варьирование в



пределах вида и в пределах конкретного пыльцевого зерна носит эволюционно приспособительный характер для обеспечения наивысшего показателя парусности.

Список литературы

1. Skogsmyr I., Lankinen E. Selection on pollen competitive ability in relation to stochastic factors influencing pollen deposition // *Evolutionary Ecology Research*. 1999. Vol. 1 (8). P. 971–985.
2. Young H. J., Stanton M. L. Influence of environmental quality on pollen competitive ability in wild radish // *Science*. 1990. Vol. 248. P. 1631–1633.
3. Quesada M., Bollman K., Stephenson A.G. Leaf damage decreases pollen production and hinders pollen performance in *Cucurbita texana* // *Ecology*. 1995. Vol. 76. P. 437–443.
4. Delph L. F., Johannsson M. H., Stephenson A. G. How environmental factors affect pollen performance: ecological and evolutionary perspectives // *Ecology*. 1997. Vol. 78. P. 1632–1639.
5. Travers S. E. Pollen performance of plants in recently burned and unburned environments // *Ecology*. 1999. Vol. 80. P. 2427–2434.
6. Parantainen A., Pulkkinen P. Pollen viability of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in different temperature conditions : high levels of variation among and within latitudes // *Forest Ecology and Management*. 2002. Vol. 167, №1–3. P. 149–160.
7. Тихонова И. В. Морфологические признаки пыльцы в связи с состоянием деревьев сосны в сухой степи // *Лесоведение*. 2005. № 1. С. 63–68.
8. Мамаев С. А. О закономерностях колебания амплитуды внутривидовой изменчивости количественных признаков в популяциях высших растений // *Журн. общ. биологии*. 1968. Т. 29, № 4. С. 413–426.
9. Третьякова И. Н., Носкова Н. Е. Пыльца сосны обыкновенной в условиях экологического стресса // *Экология*. 2004. №1. С. 1–8.
10. Некрасова Т. П. Пыльца и пыльцевой режим хвойных Сибири. Новосибирск : Наука. Сиб. отд-ние, 1983. 169 с.
11. Коба В. П. Динамика биометрических показателей пыльцы *Pinus pallasiana* D. Don в природных популяциях Горного Крыма // *Учен. зап. Тавр. нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер. Биология, химия*. 2012. Т. 25 (64), № 2. С. 77–83.
12. Коба В. П., Крестьянишин И. А. Фенология пыления и качество пыльцы сосны обыкновенной в искусственных насаждениях Крымской яйлы // *Лесоведение*. 2017. № 6. С. 424–430.
13. Бондарь Л. М., Частоколенко Л. В. Микроспорогенез как один из возможных биоиндикаторов загрязняющего воздействия автотрассы // *Биологические науки*. 2002. № 5. С. 79–84.
14. Носкова Н. Е., Третьякова И. Н. Влияние стресса на репродуктивные способности сосны обыкновенной // *Хвойные бореальной зоны*. 2006. № 3. С. 54–63.
15. Коба В. П. Исследование некоторых особенностей морфогенеза и прорастания пыльцы *Pinus pallasiana* D. Don. // *Цитология и генетика*. 2004. № 3. С. 38–45.
16. Елькина Н. А., Карпова Е. Е. Применение палиноиндикационного метода для оценки адаптивного потенциала приморских растений западного побережья Белого моря // *Учен. зап. Петрозавод. гос. ун-та*. 2015. № 8 (153). С. 52–56.
17. Третьякова И. Н. Эмбриология хвойных. Новосибирск : Наука. Сиб. отд-ние, 1990. 157 с.
18. Ткаченко А. Н., Самошкин Е. Н. Изменчивость пыльцы сосны обыкновенной на лесосеменной плантации в Брянском округе зоны широколиственных лесов // *Лесн. журн*. 2001. № 4. С. 23–27.
19. Важов В. И. Агроклиматическое районирование Крыма // *Тр. Никит. бот. сада*. 1977. Т. 70. С. 92–120.
20. Плугатарь Ю. В., Корсакова С. П., Ильницкий О. А. Экологический мониторинг Южного берега Крыма. Симферополь : ИТ «Ариал», 2015. 164 с.
21. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М. : Колос, 1980. 304 с.
22. Монозон-Смолина М. Х. К вопросу о морфологии пыльцы некоторых видов рода *Pinus* // *Бот. журн*. 1949. Т. 34, № 4. С. 352–380.
23. Мамаев С. А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. М. : Наука, 1972. 284 с.
24. Лакин Г. Ф. Биометрия. М. : Высш. шк., 1990. 352 с.
25. Сахно Т. М. Морфология и особенности реализации жизненных функций пыльцы *Pinus radiata* D. Don в условиях интродукции на Южном берегу Крыма // *Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология*. 2017. № 4. С. 124–133.
26. Nell A., Staden J. Pollen morphological features and impact of temperature on pollen germination of various *Pinus* species // *South Afr. J. of Botany*. 2005. Vol. 71, № 1. P. 88–94.

Biometric Characteristics and Aerodynamic Properties of Pollen Grains of North American Pines under Conditions of the Southern Coast of the Crimea

Yu. V. Plugatar, T. M. Sakhno

Yuri V. Plugatar, <https://orcid.org/0000-0001-5262-8957>, Labour Red Banner Order Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, 52, Spusk Nikitsky, Yalta, Nikita, 298648, Republic of the Crimea, Russia, sahno_tanya@mail.ru

Tat'yana M. Sakhno, <https://orcid.org/0000-0002-4850-342X>, Labour Red Banner Order Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, 52, Spusk Nikitsky, Yalta, Nikita, 298648, Republic of the Crimea, Russia, sahno_tanya@mail.ru



The results of the study of biometric characteristics and aerodynamic properties of pollen of North American species: *Pinus radiata* D. Don, *Pinus sabiniana* Douglas, *Pinus coulteri* D. Don and autochthonous *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, grown on the Southern Coast of the Crimea (SCC) are presented. The differences in the size of the pollen grains and their individual parameters are revealed. The pollen of introduced species is characterized by large sizes in comparison with native species. The metric parameters of the studied parameters are characterized by low amplitude of variability, which is typical for the male generative

sphere. An increase of pollen grains with a predominance of body height greater than its length in species that are less drought-resistant was noted in the region of observation. Despite the significant differences in the size of pollen grains of the studied species, they have the same coefficient of sailing capacity, which provides identical aerodynamic properties of pollen.

Key words: pollen, introduction, North American species, *Pinus radiata* D. Don, *Pinus sabiniana* Douglas, *Pinus coulteri* D. Don, morphometry, sailing capacity, Southern Coast of the Crimea.

Образец для цитирования:

Плугатарь Ю. В., Сахно Т. М. Биометрические характеристики и аэродинамические свойства пыльцевых зерен североамериканских сосен в условиях Южного берега Крыма // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 462–468. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-462-468>

Cite this article as:

Plugatar Yu. V., Sakhno T. M. Biometric Characteristics and Aerodynamic Properties of Pollen Grains of North American Pines under Conditions of the Southern Coast of the Crimea. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 462–468 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-462-468>



УДК 579.57.04

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ УСИЛЕНИЯ ДЕСТРУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА АБОРИГЕННОГО ШТАММА *PSEUDOMONAS PUTIDA* SU12, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ФЕНОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ



Н. А. Ильина, О. Ю. Ксенофонтова, С. Э. Третьякова, Е. И. Тихомирова

Ильина Наталья Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, проректор по инновационному развитию, Ульяновский государственный университет, n-ilina@mail.ru

Ксенофонтова Оксана Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ksenofontova64@mail.ru

Третьякова Светлана Эдуардовна, кандидат биологических наук, заведующий испытательной лабораторией ИЛЦ «ЭкоОС», Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., tretse1@mail.ru

Тихомирова Елена Ивановна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Экология», Саратовский государственный университет имени Гагарина Ю. А., tichomirova_ei@mail.ru

В статье представлена разработка методических подходов усиления деструктивного потенциала аборигенного штамма *Pseudomonas putida* SU12, выделенного из проб почвы, загрязненной фенольными соединениями. Описана схема циклического селективного метода поэтапного увеличения концентрации фенола в жидкофазной среде в сочетании с промежуточным этапом накопительной культуры. Авторами предложена методика увеличения показателей деструкции фенола путем повышения его концентрации в элективных средах дискретно цикл за циклом. Если в результате завершения цикла культивирования деструктивная активность отсутствовала или была меньше 50%, но клетки оставались жизнеспособными, то в следующем цикле концентрацию фенола не увеличивали. При условии активности деструкции от 50 до 80% концентрацию фенола повышали не более, чем на 25%. Если степень деструкции фенола составляла 85% и более от стартовой концентрации, то концентрацию фенола в последующем цикле увеличивали на 50%. В результате селекционной работы штамм *P. putida* SU12 приобрел способность снижать концентрацию фенола в жидкой среде на 92,6% от стартовой концентрации 340 мг/л за 7 дней. Разработанная схема процесса селекционирования штамма *P. putida* SU12 позволила значительно усилить его природный деструктивный потенциал. Исследуемый штамм-деструктор фенола не проявляет факторов патогенности и является аборигенным для Ульяновской области. Совокупность этих признаков дает возможность позиционировать штамм *P. putida* SU12 как эффективный штамм-биодеструктор фенола с высоким биотехнологическим потенциалом для дальнейшего конструирования комплексного биопрепарата.

Ключевые слова: штамм-деструктор, деструкция фенола, селективный метод, биоремедиация, загрязнение почв.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-469-472>

Введение

На сегодняшний день фенол является одним из наиболее распространенных загрязнителей, который непрерывно поступает в окружающую среду и накапливается в ней [1]. В связи с этим разработка селекционных методик адаптации бактерий-деструкторов к высоким концентрациям фенола представляет собой важную часть исследований при создании биопрепаратов [2, 3].

Ранее из проб почвы в Ульяновской области, хронически загрязненной фенолом, авторами был выделен бактериальный штамм *P. putida* SU12, способный использовать фенол в качестве единственного источника углерода и энергии и не проявляющий факторов патогенности; была проведена его идентификация, а также исследована его способность к деструкции фенола в жидкофазных средах [4]. Стандартные приемы селекции по увеличению деструктивной активности штамма *P. putida* SU12 на предыдущих этапах работ заключались в пересевах культуры с жидкой на плотную элективную среду с пошаговым увеличением концентрации фенола [4]. В результате этих действий резистентность к фенолу у штамма *P. putida* SU12 на минеральной плотной среде достигла концентрации 270 мг/л фенола, что эквивалентно 2000 ПНЕС (ПНЕС фенола составляет 0,136 мг/кг почвы), или условных доз (у.д.). Однако в жидкой элективной среде степень деструкции фенола была не слишком велика (26%) и составляла максимально около 70 мг/л (500 ПНЕС, или 500 у.д.) за 9 суток. Дальнейшее увеличение концентрации фенола в жидкой среде действовало угнетающе как на рост данного штамма, так и на его деструктивную активность.

Целью работы являлась разработка методики усиления деструктивного потенциала аборигенного штамма *Pseudomonas putida* SU12 с применением циклического селективного метода поэтапного увеличения концентрации фенола в жидкофазной среде в сочетании с промежуточным этапом накопительной культуры.



Материалы и методы

В работе использовали аборигенный штамм *P. putida* SU12, растущий на агаризованной элективной среде с содержанием фенола в количестве 270 мг/л, полученный с использованием стандартной методики пересева на плотную элективную среду с пошаговым увеличением концентрации фенола [4]. Селекция штамма по стандартной методике заключалась в последовательных пассажах культуры на агаризованных средах М9 с постепенно увеличивающимися концентрациями фенола. Агаризованную среду М9 получали добавлением в базовый состав 2 мас.% бактериального агара, стерилизовали в автоклаве при 1 атм. в течение 20 мин, после чего вносили стерильный раствор фенола [5]. Максимальная концентрация фенола в среде, при которой клетки сохраняли жизнеспособность, соответствовала 2000 PNEC (270 мг/л).

В сравнительном аспекте использовали этот же штамм *P. putida* SU12, селекционированный по разработанной нами схеме усиления деструктивного потенциала.

Концентрацию бактериальных клеток в культуральной жидкости измеряли на спектрофотометре СФ-102 при длине волны $\lambda = 630$ нм, в кювете 10 мм (ОП₆₃₀) и определяли по калибровочному графику, выражающему зависимость оптической плотности от количества клеток, определенного по стандарту мутности БАК-10 (ООО «ОРМЕТ»).

Определение концентрации фенольных соединений проводили на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies (GH 7820A, MS 5975). Пробоподготовку и экстракцию осуществляли в соответствии со стандартными методиками [6]. Степень биodeградации фенола рассчитывали как отношение разности между начальным и конечным содержанием углеводорода в пробе к его начальному содержанию и выражали в процентах.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 10 при доверительной вероятности $P = 0,95$. Повторность всех экспериментов трехкратная.

Результаты и их обсуждение

В процессе работы с аборигенным штаммом *P. putida* SU12, выделенным из хронически загрязненной фенолом почвы в Ульяновской области, появилась необходимость в усилении его деструктивного потенциала для последующего использования при конструировании биопрепарата. Нами был разработан селективный метод поэтапного увеличения концентрации фенола в жидкофазной среде в сочетании с промежуточным этапом накопительной культуры по схеме, представленной на рис. 1.

Отдельные колонии культуры деструктора, растущие на агаризованной элективной среде с содержанием фенола в количестве 270 мг/л, петлей засевают в пробирку с 5–10 мл полупитательной

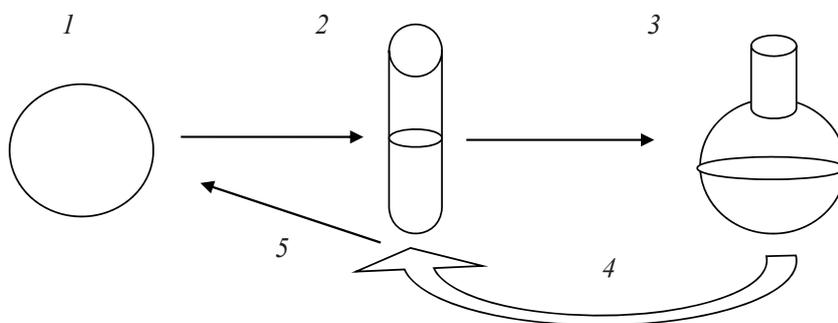


Рис. 1. Схема циклического селективного метода с промежуточным этапом накопительной культуры:

1 – пересев изолированной колонии с плотной элективной среды с фенолом в пробирку с жидкой полупитательной средой без фенола;

2 – культивирование в течение суток на круговой качалке при 170 об/мин при температуре 28–30°C. Перенос суточной культуры (инокулят) в колбу с жидкой элективной средой с фенолом;

3 – стартовая концентрация клеток 10^8 кл/мл. Концентрация фенола подбирается эмпирически и зависит от деструктивного потенциала популяции предшествующего цикла селекции. Культивирование в течение 7 суток на круговой качалке при 170 об/мин при температуре 28–30°C, определение остаточного содержания фенола;

4 – пересев на полупитательную среду без фенола, получение накопительной культуры;

5 – пассаж на плотную элективную среду М9, содержащую фенол



среды (мясопептонный бульон в разведении 1:6) без фенола (см. рис. 1, шаг 1) и помещали на роторную качалку при температуре 28–30°C при скорости вращения 220 об/мин на одни сутки (см. рис. 1, шаг 2). Выросшая накопительная культура служила инокулятом для засева в 200 мл жидкой фенолсодержащей селективной среды в колбу Эрленмейера. Инокулят с концентрацией 10^8 клеток/мл выращивали в течение 7 сут. на роторной качалке, после чего определяли концентрацию клеток и остаточного фенола в культуральной жидкости (см. рис. 1, шаг 3). Затем цикл селекции повторяли, начиная его со стадии роста в пробирке (см. рис. 1, шаг 4).

В том случае, если культура в предыдущем цикле проявила способность к росту на соответствующей концентрации фенола, и при этом происходил процесс деструкции фенола, в колбе последующего цикла в жидкой селективной среде концентрацию фенола увеличивали. Однако, если деструктивная активность отсутствовала или была меньше 50%, но клетки оставались жизнеспособными, то в колбу следующего цикла вносили фенол в такой же концентрации или ниже. При условии активности деструкции от 50 до 80% концентрацию фенола увеличивали не более, чем на 25%. Если степень деструкции фенола составляла 85% и более от стартовой концентрации, то концентрацию фенола в последующем цикле увеличивали на 50%. Кроме того, из каждой накопительной культуры делали пассаж на плотную селективную среду, содержание фенола в которой также соответственно увеличивалось (см. рис. 1, шаг 5). Это дополнительно повышало резистентность культуры, и создавался ресурс для ее воспроизведения с уже достигнутым уровнем деструктивного потенциала.

Применение циклического селективного метода поэтапного увеличения концентрации фенола в жидкофазной среде в сочетании с промежуточным этапом накопительной культуры по разработанной схеме позволило нам получить в процессе работы популяцию клеток штамма *P. putida* SU12 с повышенным фенол-деструктивным потенциалом. Прием разового пересева на полупитательную среду давал возможность культуре увеличить численность клеток, закрепив генетически значимый признак в данной популяции. Отсутствие фенола в полупитательной среде было обосновано необходимостью исключить внесение неизвестного дополнительного количества фенола, оставшегося в составе накопительной культуры, к известной стартовой концентрации его в составе жидкой селективной среды следующего цикла селекции. При этом такое кратковременное отсутствие лимитирующего компонента на активности популяции не отражалось.

Для исходной культуры деструктора лимитирующим было содержание фенола в количестве 270 мг/л (2000 PNEC), поэтому цикл селекции начинали с концентрации фенола равной 70 мг/л (500 PNEC), и увеличивали в последующих циклах согласно разработанной методике. В результате такой селекционной работы повысилась резистентность штамма *P. putida* SU12 к фенолу до 340 мг/л. Эту концентрацию использовали в качестве стартовой для оценки его деструктивной активности.

Далее были проведены исследования по сравнению степени деструкции фенола вариантами штамма *P. putida* SU12, селекционированного по стандартной методике и разработанной схеме усиления деструктивного потенциала; результаты представлены на рис. 2. Установлено, что аборигенный штамм *P. putida* SU12, селекционированный по стандартной методике, при стартовой концентрации фенола 270 мг/л снижал концентрацию в среде на 26% в течение 9 сут. (см. рис. 2, 1). Использование селекции штамма по разработанной схеме с промежуточным этапом накопительной культуры позволило увеличить степень деструкции фенола до 92% за 7 сут. (см. рис. 2, 2) при стартовой концентрации 340 мг/л.

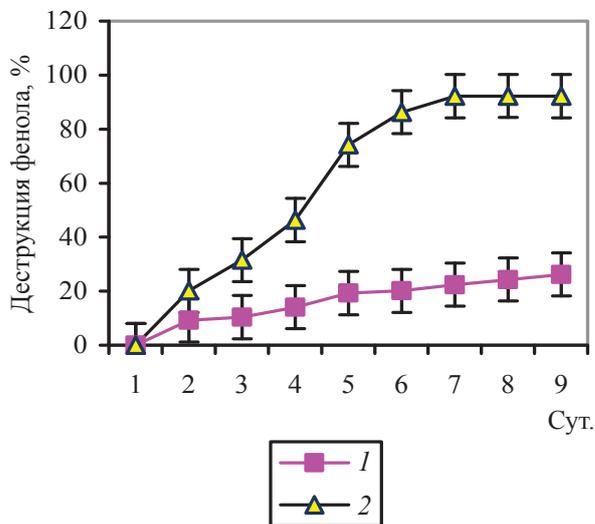


Рис. 2. Деструктивная активность штамма *Pseudomonas putida* SU12 в жидкой селективной среде с фенолом, селекционированного по методике: 1 – стандартной, 2 – разработанной

Заключение

Таким образом, предложенная селекционная схема с промежуточным этапом накопительной культуры позволила не только увеличить де-



структивный потенциал штамма *P. putida* SU12 и стартовую концентрацию фенола в среде до 340 мг/л, но и сократить время его деструкции с 9 до 7 суток.

Поскольку данный штамм является аборигенным для Ульяновской области, не проявляет факторов патогенности и является биодеструктором фенола с высоким биотехнологическим потенциалом, это дает возможность рекомендовать его для дальнейшего использования в качестве биологического компонента в комплексном био-препарате.

Список литературы

1. Горячева В. Н., Ратуев Е. А., Елисеева Е. А., Хаустов В. В., Карнюшкин А. И. Обеспечение экологической безопасности при использовании фенолов в различных отраслях промышленности // Изв. Юго-Запад. гос. ун-та. Сер. Техника и технологии. 2018. Т. 8, № 2 (27). С. 129–137.
2. Соколова И. В., Кочеткова Е. А., Никонорова С. П. Выделение, идентификация и подбор условий культивирования микроорганизмов-деструкторов фенольных загрязнений производственных сточных вод // Науч. тр. Кубан. гос. технол. ун-та. 2017. № 7. С. 26–33.
3. Макаренко А. А. Биосенсоры для детекции сульфороароматических и фенольных соединений на основе бактерий родов *Comamonas* и *Pseudomonas* – деструкторов *p*-толуолсульфата и фенола. Саратов, 2007. 144 с.
4. Ильина Н. А., Андропова Т. В., Казакова Н. А. Выделение штаммов-деструкторов фенольных соединений из хронически загрязненных почв и при экспериментальном загрязнении в лабораторных условиях // Экологические проблемы промышленных городов : сб. науч. тр. по материалам 8-й междунар. науч.-практ. конф. Саратов : СГТУ, 2017. С. 253–256.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Д. Молекулярное клонирование. М. : Мир, 1984. 477 с.
6. МУК 4.1.1062-01 Методические указания. Хромато-масс-спектрометрическое определение труднолетучих органических веществ в почве и отходах производства и потребления. М., 2001.

Developing the Algorithm of Increasing the Destructive Potential of *Pseudomonas putida* SU12 Native Strain Extracted From Phenol-Contaminated Soils

N. A. Ilyina, O. Yu. Ksenofontova,
S. E. Tretyakova, E. I. Tikhomirova

Natalya A. Ilyina, <https://orcid.org/0000-0002-3724-4661>, Ulyanovsk State University, 42, Leo Tolstoy Str., Ulyanovsk, 432017, Russia, n-ilina@mail.ru

Oksana Yu. Ksenofontova, <https://orcid.org/0000-0003-1833-1038>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ksenofontova64@mail.ru

Svetlana E. Tretyakova, <https://orcid.org/0000-0001-7576-7212>, Yuri Gagarin State Technical University, 77, Politekhnicheskaya Str., Saratov, 410054, Russia, tretse1@mail.ru

Elena I. Tikhomirova, <https://orcid.org/0000-0001-6030-7344>, Yuri Gagarin State Technical University, 77, Politekhnicheskaya Str., Saratov, 410054, Russia, tikhomirova_ei@mail.ru

The article presents the development of methodological approaches to increasing destructive potential of *Pseudomonas putida* SU12 native strain extracted from phenol-contaminated soils. The cyclic selective method on gradual increase of phenol concentration in optoelectronics environment in combination with intermediate stage of accumulative culture is described. The authors proposed a discrete, stepwise increase in the concentration of phenol in elective media depending on degree of its destruction. If, following a completed cultivation cycle, the destructive activity was absent or lower than 50%, but the cells remained viable, then in the next cycle, we were did not increase the phenol concentration. If the degree of phenol destruction was equal or over 85% of the starting concentration, then we increased the phenol concentration in the subsequent cycle by 50%. Provided destruction rate 50 to 80%, we were by 25% or less. As a result of such stepwise routine, *P. putida* SU12 strain was able to reduce phenol concentration in a liquid medium over a time span of 7 days by 92.6% of the starting concentration of 340 mg/l. The developed scheme of the *P. putida* SU12 strain selection process allowed significant strengthening of its natural destructive potential and its consolidation in its population. The studied strain of the phenol destructor showed no factors of pathogenesis and is native to the Ulyanovsk region. The combination of these features gives the possibility to position *P. putida* SU12 strain as an effective biological destructor of phenol with high biotechnological potential for developing complex biological preparation.

Key words: bioremediation, strain-destructor, *Pseudomonas putida*, phenol destruction, bioremediation, soil contamination.

Образец для цитирования:

Ильина Н. А., Ксенофонтова О. Ю., Третьякова С. Э., Тихомирова Е. И. Разработка схемы усиления деструктивного потенциала аборигенного штамма *Pseudomonas putida* SU12, выделенного из почв, загрязненных фенольными соединениями // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 469–472. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-469-472>

Cite this article as:

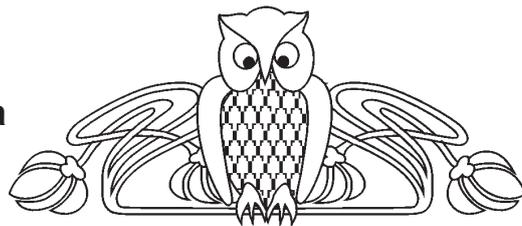
Ilyina N. A., Ksenofontova O. Yu., Tretyakova S. E., Tikhomirova E. I. Developing the Algorithm of Increasing the Destructive Potential of *Pseudomonas putida* SU12 Native Strain Extracted From Phenol-Contaminated Soils. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 469–472 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-469-472>



УДК 539.25:577.35

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНИЯ С КЛЕТКАМИ HeLa

Д. В. Терин, Д. Н. Браташов, Е. М. Ревзина, Г. Е. Роках



Терин Денис Владимирович, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры материаловедения, технологии и управления качеством, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, terinden@mail.ru

Браташов Даниил Николаевич, кандидат физико-математических наук, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, доцент кафедры инноватики на базе АО «НЕФТЕМАШ»-САПКОН, Саратов, dn2010@gmail.com

Ревзина Елена Мстиславовна, кандидат физико-математических наук, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, заведующий кафедрой инноватики на базе АО «НЕФТЕМАШ»-САПКОН, Саратов, lesya16@bk.ru

Роках Глеб Евгеньевич, студент факультета нано- и биомедицинских технологий, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, g.rokah@yandex.ru

Работа посвящена исследованию взаимодействия субмикронных частиц пористого кремния с линией клеток рака шейки матки HeLa. Подложки пористого кремния были получены двухэтапным химическим методом на основе травления пластин полупроводникового кремния плавиковой кислотой HF в смеси с нитратом серебра AgNO_3 , в присутствии перекиси водорода H_2O_2 , что приводит к образованию наночастиц серебра, последующего травления образца и механического разделения слоя на отдельные наночастицы дроблением пористого слоя. Толщина полученного слоя пористого кремния, по данным сканирующей электронной микроскопии, составила порядка 2 мкм. Средний размер наночастиц, измеренный полуконтактным методом атомной силовой микроскопии, составлял около 200 нм. Для исследования токсичности и биосовместимости получаемых частиц проводили тест метаболической активности на основе красителя *Alamar Blue*. Метаболическую активность измеряли по флуоресценции образца на длине волны возбуждения 560 нм и длине волны детекции флуоресцентного сигнала 590 нм. Наночастицы не показали заметной токсичности на линии клеток HeLa, несмотря на использование серебра и плавиковой кислоты в качестве промежуточных реагентов при их получении. В образцах, содержащих наночастицы, наблюдается небольшое увеличение метаболической активности по сравнению с контрольным образцом.

Ключевые слова: пористый кремний, наночастицы Si, клетки HeLa, токсичность.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-473-475>

Пористый кремний является одним из перспективных материалов с точки зрения биофизики, поскольку может применяться для синтеза нано- и микроразмерных люминесцентных частиц. Несмотря на то что наночастицы кремния являются по своей природе низкотоксичными и биоразлагаемыми, процесс их получения сопряжен с загрязнением различными реагентами, из которых наибольшую токсичность проявляет плавиковая кислота. Остатки реагентов приводят к тому, что вопрос токсичности и биосовместимости подобных частиц по-прежнему является спорным, и разные авторы показывают отличающиеся результаты, связанные с технологией синтеза, отмывкой частиц от реагентов, используемых при химическом травлении, побочных загрязнений при физических процессах получения, использовании веществ, обеспечивающих коллоидную стабильность [1–3].

Слои пористого кремния были получены двухэтапным химическим методом травления с помощью металла (*metal assisted etching*), подробно описанного в работах [4–7].

В качестве подложек нами использовались пластины монокристаллического кремния р-типа КДБ-4,5 с ориентацией $\langle 100 \rangle$. Травление пластин проходит в два этапа. Первый состоит в погружении подложки в раствор HF (4.8M) + AgNO_3 (0.005M) для осаждения на ней Ag. Время погружения составляло 1 минуту. На втором этапе происходило непосредственное травление с получением пористого кремния в растворе HF (5M) + H_2O_2 (0.5M) в течение 60 минут. Затем образцы погружали в HNO_3 на 1 час.

Измерения морфологии поверхности подложки со сформированным слоем пористого кремния проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на установке NTEGRA Spectra (NTMDT-SI, Зеленоград) в полуконтактном режиме с использованием зондов NSG10 (TipsNano, Зеленоград). Резонансная частота кантилевера составляла 260 кГц, паспортный радиус закругления зонда – не более 10 нм. Обработка данных измерений АСМ проводилась в программе Gwyddion 2.51 [8], в ней осуществлялось выравнивание плоскости образца, устранение



артефактов сканирования. Измерение размеров наночастиц проводилось путём извлечения профилей вдоль диаметра частицы и поиска локаль-

ных минимумов вдоль профиля, соответствующих зазорам между частицами. Средний диаметр частицы составлял порядка 200 нм (рис. 1).

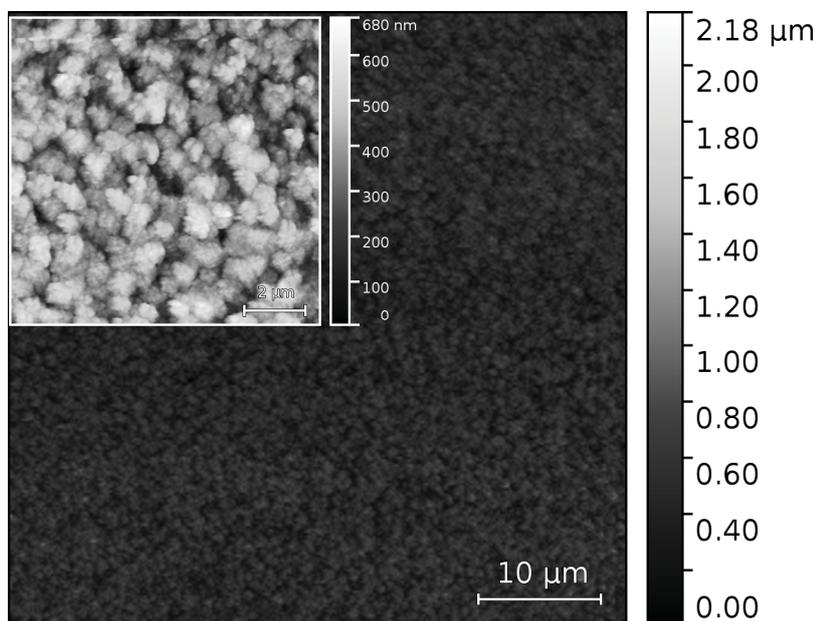


Рис. 1. Слой пористого кремния перед его механическим разрушением (атомно-силовая микроскопия)

Толщина пористого слоя, по данным СЭМ, составила 2,32 мкм. Наночастицы кремния были получены последующим механическим дроблением слоя пористого кремния на отдельные частицы субмикронного размера.

Научный интерес представляет то, как остаточные количества используемого при травлении серебра влияют на итоговую токсичность получаемых частиц. Для определения цитотоксичности в наших экспериментах использовалась клеточная линия рака шейки матки HeLa.

Клетки высевали на 96-луночный культуральный планшет в количестве 10^4 клеток на лунку. К клеткам добавляли тестируемое вещество в количестве 2,5; 5; 7,5; 10 мкл на лунку и инкубировали в течение 12 часов. После чего в каждую лунку вносили краситель *Alamar Blue* в количестве 10% от объема среды и инкубировали в течение 6 часов. Измерение флуоресценции проводили с помощью мультипланшетного ридера Synergy H1 (возбуждение на 560 нм/детекция на 590 нм) (рис. 2).

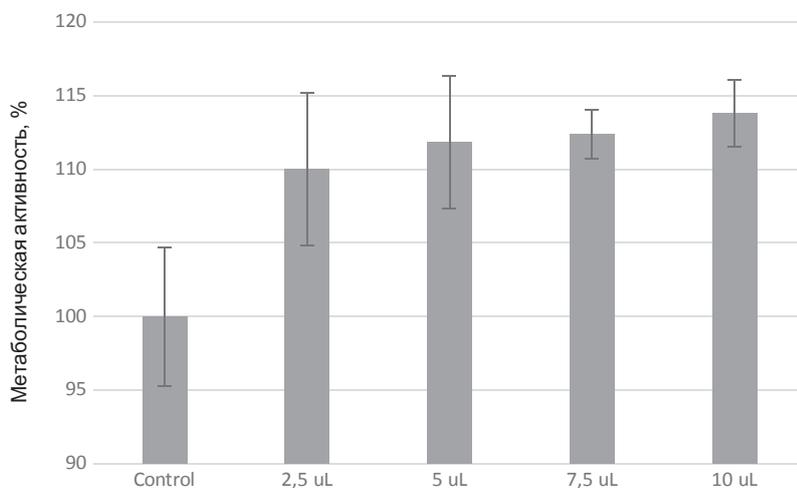


Рис. 2. Метаболическая активность контрольной культуры клеток и культуры клеток в присутствии частиц кремния в различных концентрациях



Результаты исследования показали, что частицы кремния в концентрации 2,5; 5; 7,5; 10 мкл приводят к увеличению метаболической активности клеток HeLa на 10–14% соответственно, по сравнению с контролем. Данный эффект для других разновидностей частиц субмикронных размеров обычно объясняют за счёт лучшей адгезии клеток при наличии подобных частиц. Также возможно, что добавление биоразлагаемых частиц кремния в среду для роста клеток немного меняет его свойства, повышая метаболическую активность клеток за счёт других эффектов [9].

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-07-00752а).

Список литературы

1. Durnev A. D., Solomina A. S., Daugel-Dauge N. O., Zhanataev A. K., Shreder E. D., Nemova E. P., Shreder O. V., Veligura V. A., Osminkina L. A., Timoshenko V. Y., Seredenin S. B. Evaluation of genotoxicity and reproductive toxicity of silicon nanocrystals // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2010. Vol. 149, iss. 4. P. 445–454.
2. Zhi Bo, Mishra S., Hudson-Smith N. V., Kortshagen U. R., Haynes Ch. L. Toxicity Evaluation of Boron- and Phosphorus-Doped Silicon Nanocrystals toward *Shewanella oneidensis* MR-1 // *ACS Appl. Nano Mater.* 2018. Vol. 1, iss. 9. P. 4884–4893.
3. Fucikova A., Valenta J., Pelant I., Hubalek Kalbacova M., Broz A., Rezek B., Kromka A., Bakaeva Z. Silicon nanocrystals and nanodiamonds in live cells : photoluminescence characteristics, cytotoxicity and interaction with cell cytoskeleton // *RSC Adv.* 2014. № 4. P. 10334–10342.
4. Najar A., Slimane A. B., Hedhili M. N., Anjum D., Sougrat R. Effect of hydrofluoric acid concentration on the evolution of photoluminescence characteristics in porous silicon nanowires prepared by Ag – assisted electroless etching method // *J. of Appl. Phys.* 2012. № 112. P. 1–6.
5. Lin L., Sun G. X. Synthesis and Photoluminescence Properties of Porous Silicon Nanowire Arrays // *Nanoscale Res. Lett.* 2010. № 5. P. 1822–1828.
6. Iatsunskiy I., Smyntyna V., Pavlenko N., Sviridova O. Peculiarities of Photoluminescence in Porous Silicon Prepared by Metal-Assisted Chemical Etching // *ISRN Optics.* 2012. Vol. 2012. P. 1–6.
7. Huang J., Jing Z., Yin W., Hui F. Metal-assisted chemical etching of silicon: a review // *Adv. Mater.* 2011. Vol. 44, iss. 23. P. 285–308.
8. Nečas D., Klapetek P. Gwyddion : an open-source software for SPM data analysis // *Cent. Eur. J. Phys.* 2012. Vol. 10, iss. 1. P. 181–188.
9. Haidary S. M., Córcoles E. P., Ali N. K. Nanoporous Silicon as Drug Delivery Systems for Cancer Therapies // *J. of Nanomaterials.* 2012. Vol. 2012. ID 830503. P. 1–15.

Investigation of Interaction Between Silicon-Based Nanoparticles and HeLa Cells

D. V. Terin, D. N. Bratashov, E. M. Revzina, G. E. Rokakh

Denis V. Terin, <https://orcid.org/0000-0003-2850-4406>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, terinden@mail.ru

Daniil N. Bratashov, <https://orcid.org/0000-0002-2096-4478>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, dn2010@gmail.com

Elena M. Revzina, <https://orcid.org/0000-0002-1287-5651>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, lesya16@bk.ru

Gleb E. Rokakh, <https://orcid.org/0000-0001-8845-2084>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, g.rokakh@yandex.ru

This work is about the investigation of the interaction of porous silicon submicron particles with the HeLa cervical cancer cell line. Substrates of the porous silicon were obtained with the two-staged chemical method based on synthesis of silver nanoparticles from silver nitrate $AgNO_3$ with the subsequent etching with fluoric acid HF in the presence of hydrogen peroxide H_2O_2 and mechanical separation of microparticles by shattering. The thickness of the obtained porous silicon layer measured by scanning electron microscopy (SEM), was about 2 mkm. The size of separate particles in the layer, measured by the semicontact atomic force microscopy method was about 200 nm. Testing of metabolic cell activity for cytotoxicity and biocompatibility of the obtained particles was done with Alasar Blue dye. Metabolic activity was measured by fluorescence of the sample with the excitation wavelength 560 nm and detection wavelength 590 nm. Nanoparticles do not show noticeable cytotoxicity with the HeLa cell line despite using silver nanoparticles and fluoric acid as intermediate reagents for their making. There is some increase in metabolic activity in the all samples containing submicron particles compared to the control sample.

Key words: porous silicon, Si nanoparticles, HeLa cells, toxicity.

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-07-00752а).

Образец для цитирования:

Терин Д. В., Браташов Д. Н., Ревзина Е. М., Роках Г. Е. Исследование взаимодействия наночастиц кремния с клетками HeLa // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2018. Т. 18, вып. 4. С. 473–475. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-473-475>

Cite this article as:

Terin D. V., Bratashov D. N., Revzina E. M., Rokakh G. E. Investigation of Interaction Between Silicon-Based Nanoparticles and HeLa Cells. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 473–475 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-473-475>



ЭКОЛОГИЯ

УДК 595.782

ПРОДВИЖЕНИЕ ГРУШЕВОЙ ПЛОДОЖОРКИ *CYDIA PYRIVORA* (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) НА СЕВЕРО-ВОСТОКЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

В. В. Золотухин, В. В. Аникин

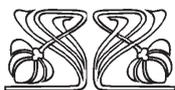
Золотухин Вадим Викторович, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии и химии, Ульяновский государственный педагогический университет имени И. Н. Ульянова, v.zolot@mail.ru

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

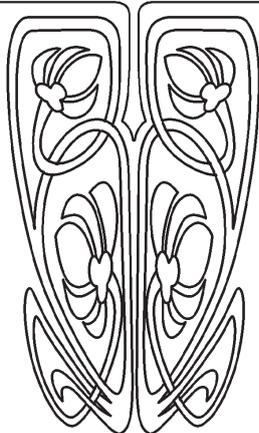
В регионе грушевая плодожорка *Cydia pyrivora* (Danilevsky, 1947) является узким олигофагом, чьи гусеницы питаются сердцевинной и мякотью плодов груш. Рассмотрено изменение границ ареала грушевой плодожорки *Cydia pyrivora* (Lepidoptera: Tortricidae) за 60-летний период на северо-востоке европейской части России. За последнее 10-летие отмечается достаточно быстрое продвижение вида на север по пойме реки Волги до центра Ульяновской области. При сохранении такой тенденции расселения вида можно ожидать появление грушевой плодожорки в Левобережье Самарской области, а также в Татарстане и Нижегородской области. Биотопически вид привязан к хорошо прогреваемым садовым участкам и брошенным садам с грушевыми деревьями.

Ключевые слова: биогеография, фауна, насекомые, чешуекрылые, грушевая плодожорка, *Cydia pyrivora*, Среднее Поволжье.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-476-479>



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Грушевая плодожорка *Cydia pyrivora* (Danilevsky, 1947) является узким олигофагом, чьи гусеницы питаются сердцевинной и мякотью плодов груш. Рассмотрение биологии и границ ареала в конце 50-х гг. прошлого столетия [1] позволило констатировать прохождение северной границы распространения вида по линии Львов – Киев – Воронеж – Тамбов – север Волгоградской области. Основой питания гусениц вида, как представлялось ранее энтомологами, выступали плоды дикой груши (*Pyrus communis*), а потому считалось, что распространение вида лимитировалось распространением дикой груши. Позднее было установлено, что грушевая плодожорка может развиваться и на культивируемых сортах груши и выступать в качестве их специализированного вредителя [2].

Вышедший в 2008 г. каталог по чешуекрылым России [3] позволил оценить произошедшие за 50 лет изменения границ ареала на северо-востоке (рис. 1) для грушевой плодожорки.

Как видно на рис. 1, за 50 лет (с 1958 по 2008 г.) произошло продвижение границы ареала вида повсеместно на севере и се-



Рис. 1. Расширение северо-восточной границы ареала вида *Cydia pyrivora*: — — — — 1958 г. [1]; - - - - 2008 г. [2]; - · - · - 2017 г. [6]

веро-востоке на 100–300 км, что сопоставимо с ежегодным продвижением вида на 2–6 км в год. Небольшие размеры бабочки, слабая миграционная активность и, как следствие, небольшие возможности ее длительных активных перелетов представляют определенные ограничения в темпах продвижения вида на север и северо-восток, несмотря на наличие кормовой базы для гусениц практически повсеместно. Для более крупных и активных видов бабочек наблюдается более быстрое продвижение, что характерно, например, для облепихового бражника *Hyles hipporphaes* [4], который всего за 30 лет смог продвинуться с юга на север вдоль Волги на 800 км.

Детальное изучение фауны микрочешуекрылых Волго-Уральского региона в рамках проекта подготовки книги «Fauna lepidopterologica Volgo-Uralensis: from P. Pallas to present days» позволило авторам детализировать границы вида в Среднем Поволжье и установить наличие грушевой плодовой гусеницы на территории Ульяновской области [5, 6]. Здесь этот вид отмечен лишь в нескольких точках на хорошо

прогреваемых и защищенных от ветра обрывистых склонах правого берега Волга, где вид крайне локально встречается в плодовых садах. Он не был характерен для садов до 2010 г., а в настоящее время гусеницами этого вида поражается до 50% плодов груши [7]. Повреждается сердцевина плода (рис. 2).

На открытых и продуваемых пологих берегах левого берега вид не отмечен, несмотря на обилие потенциальных растений. Достаточно быстрое продвижение вида вдоль Волги от границы Саратовской области до Ульяновской области на 200 км за 10-летний период (ежегодное продвижение на 20 км) пока не находит достаточно объективных объяснений, но, вероятно, не связано со случайным заносом или импортом зараженных фруктов.

При сохранении такой тенденции расселения можно ожидать появления этого вида в Левобережье Самарской области, а также в Татарстане и Нижегородской области, хотя последняя специальная сводка по листоверткам Нижегородской области [8] пока не подтверждает здесь нахождение этого вида.



Рис. 2. Повреждение гусеницей грушевой плодовой гусеницы сердцевины плода (фото В. Долгунова)

Следует также констатировать, что в последнее десятилетие ареал вида значительно расширился и на северо-западе, западе европейской части за пределами России, где грушевая листовертка была обнаружена во многих западноевропейских странах [9, 10].

Список литературы

1. Шельдешова Г. Г. Биология грушевой плодовой гусеницы (*Carposarza pyrivora* Danil.) // Учен. зап. ЛГУ. Сер. биол. науки. 1958. Вып. 46, № 240. С. 88–121.
2. Данилевский А. С., Кузнецов В. И. Фауна СССР. Насекомые чешуекрылые (Insecta: Lepidoptera: Tortricidae). Т. 5, вып. 2. Плодожорки Laspeyresinae. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1968. 636 с.
3. Синев С. Ю. Каталог чешуекрылых (Lepidoptera) России. СПб.; М.: Т-во науч. изд. КМК, 2008. 424 с.
4. Аникин В. В. К распространению бражника облепихового – *Hyles hippophaes* (Esper, 1793) (Lepidoptera, Sphingidae) в Нижнем Поволжье // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2004. Вып. 3. С. 40–41.
5. Аникин В. В., Золотухин В. В., Сачков С. А. Итоги инвентаризации фауны чешуекрылых (Insecta: Lepidoptera) Волго-Уральского региона // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2015. Т. 15, вып. 2. С. 53–59.
6. Anikin V. V., Sachkov S. A., Zolotuhin V. V. Fauna lepidopterologica Volgo-Uralensis: from P. Pallas to present days // Proc. of the Museum Witt Munich. 2017. Vol. 7. P. 1–696.
7. Долгунов В. А. Грушевая плодовая гусеница *Cydia pyrivora* как новый вид листоверток Ульяновской области (Lepidoptera: Tortricidae) // Природа Симбирского Поволжья. 2015. Вып. 16. С. 86–89.
8. Корб С. К., Пожогин Д. А., Затаковой А. А., Тальяк Р. Е. Фауна листоверток (Lepidoptera: Tortricidae) Нижегородской области // Тр. Морд. гос. заповедника им. П. Г. Смидовича. 2018. № 20. С. 98–111.
9. Razowski J. Tortricidae of Europe. Vol. 2. Olethreutinae. František Slamka, Bratislava, 2003. 301 p. 95 b/w plates, 18 colour plates.
10. Larsen K. The distribution of *Cydia pyrivora* (Lepidoptera, Tortricidae) // Phegea. 2010. Vol. 38, № 1. P. 1–4.

The Spreading of Pear Moth – *Cydia pyrivora* (Lepidoptera: Tortricidae) on the North-East of the European Part of Russia

V. V. Zolotuhin, V. V. Anikin

Vadym V. Zolotuhin, <https://orcid.org/0000-0001-6403-7433>, State Pedagogical University, 4, Square 100 Anniversary of Lenin's Birth, Ulyanovsk, 432700, Russia, v.zolot@mail.ru



Vasilii V. Anikin, <https://orcid.org/0000-0001-8575-5418>, Saratov State University, 83, Astrakhanskay Str., Saratov, 410012, Russia, AnikinVasiliiV@mail.ru

Pear moth – *Cydia pyrivora* is a narrow oligophage, whose larvae feed on the pith and pulp of fruit pears. In the region the species is connected here with warm biotopes on the Volga's slopes and inhabits garden plots and abandoned gardens with pear trees. The areal extent in the north-east of the European part of Russia is

considered for the pear moth *Cydia pyrivora* over a 60-year period. Over the past decade there has been quite a rapid expansion of the species to the north on the floodplain of the Volga river up to the Centre of the Ulyanovsk Province. If such trends of the diffusion of the species continue, it is possible to expect the emergence of the pear moth on the Left Bank of Volga in the Samara Province, as well as in Tatarstan and the Nizhny Novgorod Province.

Key words: biogeography, fauna, insects, Lepidoptera, pear moth, *Cydia pyrivora*, Middle Volga Region.

Образец для цитирования:

Золотухин В. В., Аникин В. В. Продвижение грушевой плодовой моли *Cydia pyrivora* (Lepidoptera: Tortricidae) на северо-востоке европейской части России // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 476–479. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-476-479>

Cite this article as:

Zolotuhin V. V., Anikin V. V. The Spreading of Pear Moth – *Cydia pyrivora* (Lepidoptera: Tortricidae) on the North-East of the European Part of Russia. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 476–479 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-476-479>



УДК [578.294:591.5] (470.44)

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОЛОНИИ И ОСОБЕННОСТИ ГНЕЗДОВАНИЯ ОБЫКНОВЕННОГО СКВОРЦА (*STURNUS VULGARIS*) И ПОЛЕВОГО ВОРОБЬЯ (*PASSER MONTANUS*) В ЗЕЛЕННОЙ ЗОНЕ г. ЭНГЕЛЬСА



Е. Ю. Мельников, В. С. Гавриленко

Мельников Евгений Юрьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры морфологии и экологии животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, skylark88@yandex.ru

Гавриленко Виктория Сергеевна, магистр кафедры ботаники и экологии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, udc-4@yandex.ru

В работе представлены данные об особенностях гнездования обыкновенного скворца и полевого воробья в условиях антропогенно трансформированного лесного массива у г. Энгельса Саратовской области. Выявлена избирательность птиц при выборе гнездовых дупел. Исследовано использование птицами гнездовых деревьев в разном жизненном состоянии. С помощью метода «ближайшего соседа» проведена оценка пространственного распределения гнездовых участков. Получены значения коэффициента распределения Кларка–Эванса для гнезд каждого вида и для суммарного распределения гнезд, расстояние случайного распределения и среднее минимальное расстояние между жилыми дуплами. Установлены особенности использования птицами городской зеленой зоны во время гнездования. В течение всего сезона размножения биотопы обследованного участка равномерно насыщены гнездами обоих видов. Полевой воробей проявляет большую избирательность, чем обыкновенный скворец, предпочитая гнездовые деревья в сильно ослабленном состоянии, а также дупла естественного происхождения и небольших размеров. Благодаря разной избирательности и разным стратегиям использования биотопов обследованного участка оба вида птиц стабильно сохраняют высокую плотность в лесном массиве.

Ключевые слова: обыкновенный скворец, полевой воробей, гнездовое дупло, пространственное распределение, метод ближайшего соседа.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-480-486>

Птицы-дуплогнезdnики – чрезвычайно разнородная группа птиц, чувствительная к состоянию древостоя в экосистемах. Они являются биоиндикаторами изменений в среде обитания благодаря своей зависимости от состава и структуры лесных массивов и искусственных посадок. На примере этой группы изучались фундаментальные проблемы эволюционной и популяционной биологии и различные аспекты экологии птиц как в России, так и за рубежом [1–4].

Особое значение имеют исследования птиц-дуплогнезdnиков в урбанизированной среде, где происходит сокращение площади и ухудшение состояния древесных насаждений. Этот процесс неоднозначно влияет на популяции дуплогнезdnиков. С одной стороны, в ослабленных деревьях птицы находят больше подходящих мест для гнездования. С другой стороны, усиление антропогенной трансформации насаждений, расширение дорожно-тропиночной сети, увеличение влияния фактора беспокойства приводят к уменьшению плотности ряда видов [5–7].

Обыкновенный скворец (*Sturnus vulgaris* Linnaeus, 1758) и полевой воробей (*Passer montanus* Linnaeus, 1758) являются одними из самых распространенных видов вторичных дуплогнезdnиков. Они широко распространены на территории Европейской России. В городской среде оба вида встречаются в районах с разной степенью трансформации: от дачных массивов и лесопарков до районов многоэтажной застройки. Вопросам гнездования этих птиц в разных городах посвящено значительное количество публикаций [4, 6, 8–11]. Однако значительно реже проводились работы, связанные с изучением совместного гнездования видов. Во многих трансформированных лесных массивах обыкновенные скворцы и полевые воробьи гнездятся в непосредственной близости друг от друга и образуют смешанные колонии [11]. В связи с этим целью нашего исследования стало изучение динамики пространственного распределения гнездовых участков обыкновенного скворца и полевого воробья в условиях зеленых насаждений городской черты.

Материалы и методы

Исследования проводились на модельном участке зеленой зоны «Лесной поселок» г. Энгельса (51°29.784' N, 46°4.197' E), расположенном на берегу Волгоградского водохранилища р. Волги [12]. Он представляет собой фрагмент типичной поймы, измененной после затопления водохранилища. Древесная растительность Лесного поселка включает ивняки, тополевики (белотопелевики и осокорники) и дубравы,



сменяющие друг друга в зависимости от режима увлажнения. Основными видами деревьев являются тополь черный (*Populus nigra* L.), тополь белый (*Populus alba* L.), дуб обыкновенный (*Quercus robur* L.) и ива белая (*Salix alba* L.). Присутствуют посадки клена американского (*Acer negundo* L.) и лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.). В связи с подъемом уровня воды Волгоградского водохранилища и подтоплением поймы многие деревья находятся в ослабленном или сильно ослабленном состоянии. Обследованная площадка (0,43 км²) располагается на берегу озера Сазанка. Участок характеризуется высокой рекреационной нагрузкой, обусловленной густой дорожно-тропиночной сетью, возможностью заезда автотранспорта и большим количеством мест отдыха [13].

Сбор материала осуществлялся в гнездовые сезоны 2015–2017 гг. Данные о гнездовой плотности птиц получены с помощью общепризнанных методов маршрутных учетов и картирования территории, проводившихся с марта по июль [14, 15]. Учеты проводились в утренние часы после восхода солнца, в период максимальной активности большинства птиц. Поиск гнездовых дупел проводился путем наблюдения за выкармливающими родителями и по крикам птенцов [15]. Точная привязка к местности гнездовых участков и дупел осуществлялась с помощью навигатора GPS [16]. При описании дупел определялись сле-

дующие параметры: тип дупла, вид гнездового дерева, его жизненное состояние по Алексею [17]. Составление и обработка карт проводились в среде MapInfo 8.5 на основе спутниковых фотографий исследованной площадки [13]. Во время анализа распределения обыкновенного скворца и полевого воробья точки регистраций наносились на оцифрованную карту зеленой зоны масштаба 1:25000.

Математическая обработка характеристик пространственного распределения: плотность гнездования и тип распределения гнезд получена с помощью авторской программы С. П. Харитоновой «Colonmap» [16, 18, 19]. Пространственное распределение оценивалось методом «ближайшего соседа», позволяющим рассчитывать коэффициент распределения по Кларку–Эвансу R [20]. Сравнение выборок данных проводилось по критерию хи-квадрат (χ^2) [21]. За время исследования найдено и обследовано 34 гнездовых дупла, из них 22 гнезда обыкновенного скворца, 12 гнезд полевого воробья.

Результаты и их обсуждение

На обследованной площадке зеленой зоны «Лесной поселок» плотность населения обыкновенного скворца и полевого воробья характеризуется высокими значениями и составляет 102,4 и 55,8 особей/км² соответственно [22]. Схема колонии птиц представлена на рис. 1.

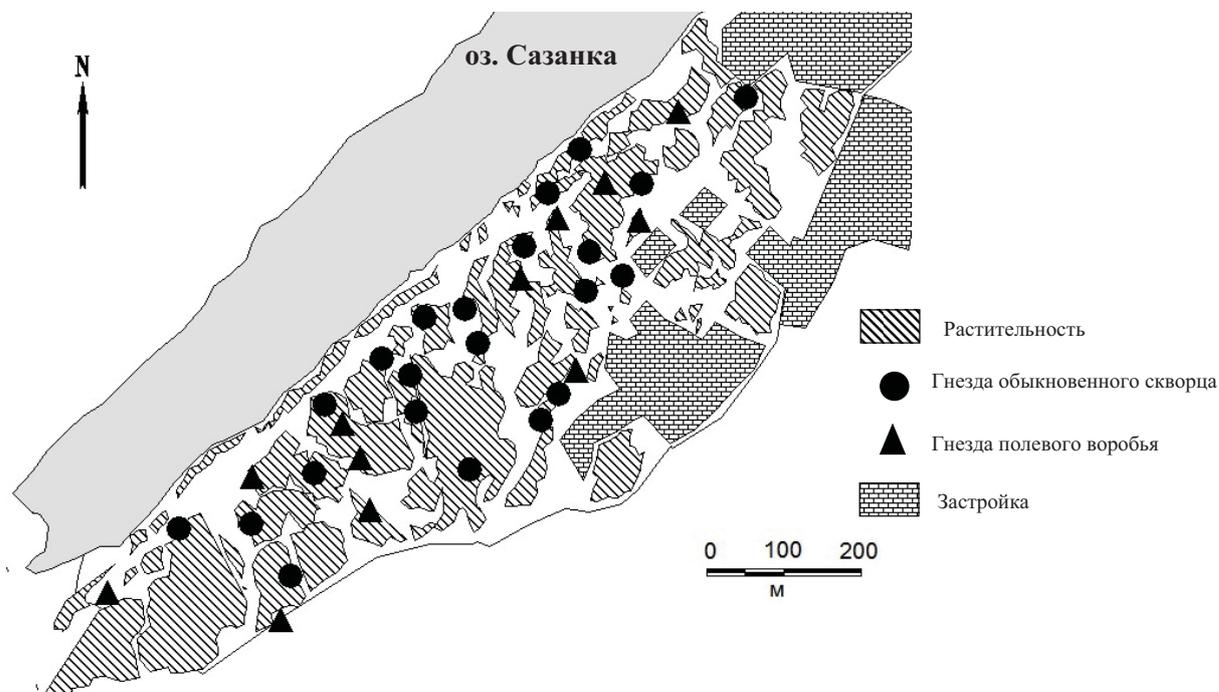


Рис. 1. Схема колонии обыкновенного скворца и полевого воробья на участке зеленой зоны г. Энгельса



Оба вида селятся на всей территории площадки, как у построек человека, так и возле озера. Птицы используют при гнездовании два типа укрытий: старые дупла дятлов (пестрого, седого, сирийского) и естественные ниши в стволах деревьев, образовавшиеся в результате гниения древесины. Оба типа дупел встречаются здесь в достаточных количествах, так как плотность дятлообразных в указанном место-

обитании достаточно высокая, а большинство видов дятлов каждый год строят новые дупла [23]. Кроме того, состояние многих деревьев ослабленное, что приводит к гниению древесины и образованию дупел естественного происхождения.

Полученные результаты показали следующее распределение типов дупел обыкновенного скворца и полевого воробья (рис. 2).

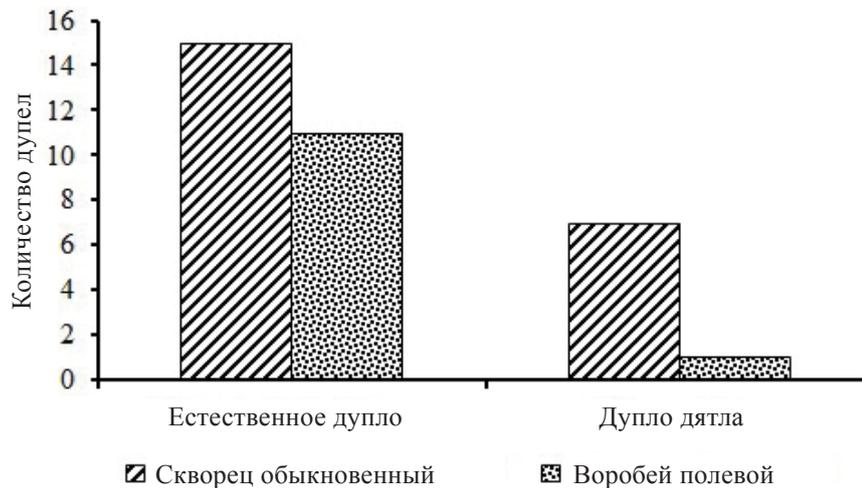


Рис. 2. Распределение дупел обыкновенного скворца и полевого воробья по происхождению, 2015–2017 гг.

Из представленных данных следует, что оба вида птиц чаще предпочитают гнездиться в укрытиях, появившихся в деревьях в результате гниения древесины. Дупла дятлов используются птицами значительно реже; главным образом их занимают скворцы. Это связано с более крупным размером летка и большей глубиной, чем у естественных укрытий и приводит к заселению таких дупел более крупными птицами, в частности обыкновенным скворцом. Более мелкие птицы (воробьи, синицы, поползни) используют дупла дятлов реже и в основном во время ночевки [23, 24].

Полевые воробьи предпочитают селиться в укрытиях естественного типа с более узкими летками и менее доступными для хищников. На обследованном пойменном участке было найдено всего одно гнездо полевого воробья, устроенное в дупле малого дятла. Такие дупла лучше подходят для гнездования воробьев, однако плотность малого дятла, в отличие от других дятлов р. *Dendrocopos*, в Лесном поселке невелика и его дупла встречаются редко [13].

Обыкновенный скворец и полевой воробей используют при гнездовании три вида деревьев: два

вида тополей и вяз гладкий. Распределение гнезд птиц по видам деревьев представлено на рис. 3.

Анализ рис. 3 показывает, что вторичные дуплогнездники чаще устраивают гнезда в тополе черном. В тополе белом в большинстве случаев располагались гнезда обыкновенного скворца. Вяз гладкий использовался птицами крайне редко.

Избирательность в гнездовании обусловлена особенностями древостоя около озера Сазанка. Осокорники более разрежены и ослаблены, чем белотопольники. В них птицам проще найти корм и место для гнездования. В то же время на этих участках находятся все крупные дороги и тропы. Непосредственно к осокорникам примыкает жилая застройка частного сектора, где продолжают возводиться новые дома. Вследствие этого наблюдается увеличение фактора беспокойства, заставляющего птиц покидать прежние гнездовые участки.

В белотопольниках деревья располагаются более плотно. Здесь чаще гнездятся дятлы, дупла которых занимают скворцы. Места отдыха людей находятся на периферии, а в центральной части беспокойство со стороны людей становится значительно ниже. В результате

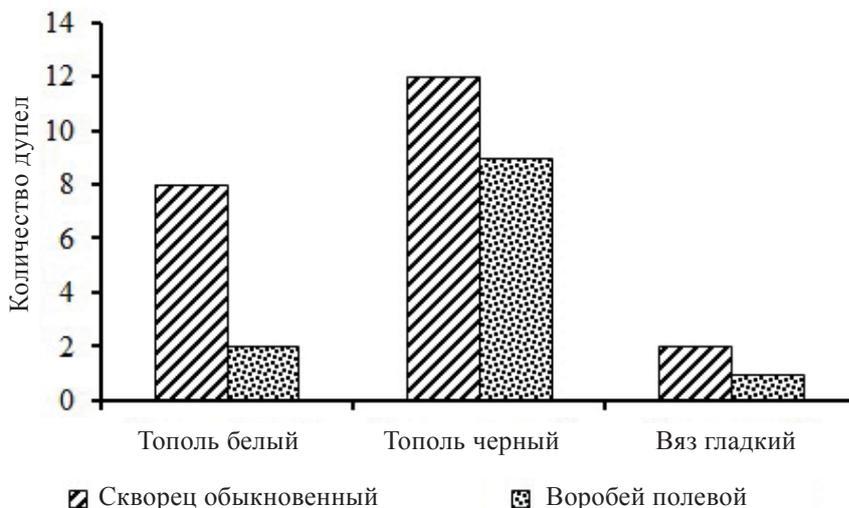


Рис. 3. Распределение дупел обыкновенного скворца и полевого воробья по видам деревьев, 2015–2017 гг.

большинство гнезд скворцов располагалось именно в центре белотопольников [13].

Жизненное состояние – ещё один важный параметр гнездового дерева птиц-дуплогнездящих.

Нами было проанализировано жизненное состояние деревьев, в которых располагались гнезда обыкновенного скворца и полевого воробья (рис. 4).

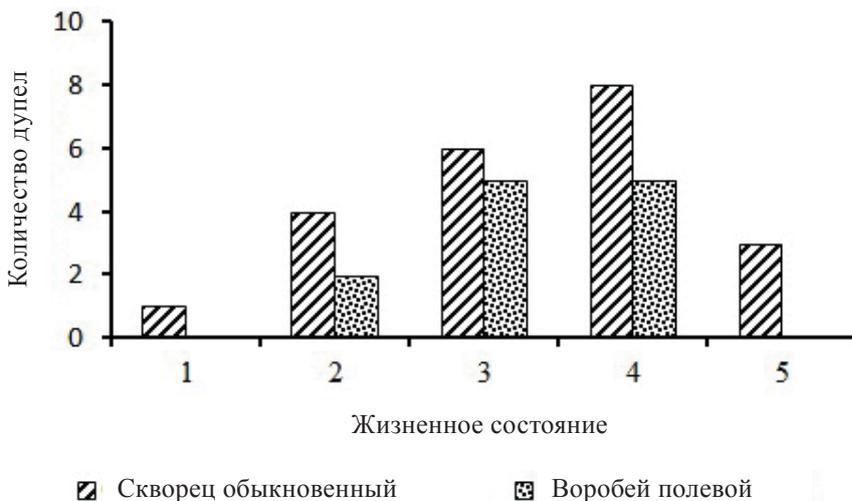


Рис. 4. Жизненное состояние гнездовых деревьев обыкновенного скворца и полевого воробья, 2015–2017 гг.

Из полученных данных следует, что наименее часто птицы селятся в здоровых (категория 1) или погибших (категория 5) деревьях. Это связано с тем, что в здоровых деревьях дупла и полости почти не встречаются. Погибшие тополя легко ломаются и падают при порывах ветра, вследствие чего во время гнездования используются птицами редко.

На обследованном участке трансформированной поймы обыкновенный скворец проявляет меньшую избирательность при выборе мест

размножения, чем полевой воробей. Значение критерия хи-квадрат для частотного распределения гнездовых деревьев скворца: $\chi^2 = 6.64$, $p = 0.16$, что говорит о недостоверных отличиях. Полевой воробей, напротив, проявляет большую избирательность, что подтверждается значением критерия: $\chi^2 = 10.5$, $p = 0.03$. Так, десять из двенадцати гнезд воробья располагались в сильно ослабленных или усыхающих деревьях. Такие экземпляры тополей и вязов чаще имеют подходящие для воробья дупла, небольших размеров



и с узким летком. Таким образом, обыкновенный скворец и полевой воробей отличаются своей избирательностью гнездовых дупел. Первый вид использует деревья всех жизненных состояний, а второй – предпочитает деревья в сильно ослабленном или усыхающем состоянии. Это отличие подтверждается критерием хи-квадрат: $\chi^2 = 15.5$, $p = 0.004$.

Анализ пространственного распределения гнезд обыкновенного скворца и полевого воробья позволил оценить насыщенность биотопа, состояние популяции и характер межвидовых взаимодействий [18, 25]. Размещение гнездовых участков изученных видов в зеленой зоне «Лесной поселок» было оценено для двух гнездовых сезонов: 2015 и 2016 гг. (таблица).

Пространственное распределение регистраций гнезд и гнездовых участков обыкновенного скворца и полевого воробья 2015–2016 гг.

Вид птицы	R (по Кларку–Эвансу)	P	Тип распределения	Расстояние, м	
				случайного распределения	среднее минимальное
Скворец	1.21	0.03	Равномерное	27.0	32.5 ± 2.5
Воробей	1.24	0.05		47.0	58.4 ± 5.4
Совместно	1.15	0.04		27.6	31.7 ± 2.0

Как следует из данных таблицы, пространственное распределение гнезд обыкновенного скворца и полевого воробья носит равномерный характер. Совместное распределение дупел обоих видов также равномерное. Расстояние случайного распределения варьирует от 27.0 до 47.0 м. Ближе друг к другу располагаются гнезда скворцов: среднее минимальное расстояние между их дуплами составляет 32.5 ± 2.5 м; воробьи селятся дальше друг от друга: среднее расстояние между их гнездами имеет большее значение 58.4 ± 5.4 м.

Полученные данные указывают на высокую насыщенность биотопов зеленой зоны «Лесной поселок» гнездовыми участками птиц [18]. Это объясняется спецификой условий данной местности. В ослабленных тополях имеется большое количество мест гнездования: естественных полостей и дупел, выдолбленных дятлами. Кроме того, участки тополевинок чередуются с обширными полянами с невысоким травостоем, где птицам удобно добывать корм.

Второй фактор, определяющий равномерное распределение дупел обыкновенного скворца и полевого воробья, – высокая гнездовая пластичность обоих видов [25–28]. Птицы могут использовать для размножения разные типы дупел и гнездовых деревьев разного жизненного состояния. Однако, несмотря на большую пластичность и достаточное количество подходящих мест для устройства гнезд, у обыкновенного скворца и полевого воробья наблюдается заметное разделение гнездовых

ниш. Обыкновенные скворцы заселяют большой диапазон дупел, используя как естественные укрытия, так и дупла дятлов, в то время как полевые воробьи чаще предпочитают именно дупла естественного происхождения, причем небольших размеров. Гнезда обыкновенных скворцов встречаются в деревьях всех жизненных состояний, а воробьев – преимущественно в сильно ослабленных и усыхающих.

Следует отметить, что у птиц наблюдаются различия в смене дупел. Полевые воробьи отличаются большим постоянством в выборе гнездового дерева, предпочитая гнездиться в одних и тех же дуплах, нежели скворцы. У обыкновенного скворца происходит смена мест гнездования: в один сезон птицы выбирают деревья вблизи от застроек зеленой зоны (в начальной части «Лесного поселка»), в другой сезон размножения – в дальней, южной части обследованной площадки. Такая стратегия позволяет птицам максимально эффективно использовать гнездовые ресурсы зеленой зоны.

Кроме того, часть скворцов и полевых воробьев использует для гнездования постройки человека в прилегающем частном секторе. Птицы селятся на чердаках, в пустотах зданий и в искусственных гнездовьях, развешенных в некоторых дворах. Благодаря этой особенности птицы успешно размножаются даже в условиях крупных городов [11]. Однако плотность обыкновенного скворца в прилегающем частном секторе значительно ниже, чем в зеленой зоне (70.1 и 102.4 особей/км² соответственно). Гнездовая



плотность полевого воробья в частном секторе, наоборот, незначительно превышает плотность в природных местообитаниях: 67.3 и 55.8 особей/км² соответственно. Данная особенность свидетельствует о дополнительном разделении гнездовых ниш между двумя видами, позволяющем максимально эффективно использовать ресурсы среды.

Таким образом, в условиях трансформированного пригородного лесного массива популяции обыкновенного скворца и полевого воробья характеризуются высокой численностью и стабильным состоянием. Это связано с ослабленным состоянием древостоя и большим количеством мест для гнездования. Разделение ниш видов в связи с разными местами гнездования, типами дупел и жизненным состоянием привело к минимальной конкуренции между видами. В таких условиях распределение гнезд носит равномерный характер, что говорит о максимальном насыщении биотопа гнездовыми участками вторичных дуплогнезdnиков.

Список литературы

1. Зацаринный И. В., Константинов В. М. Особенности размножения птиц-дуплогнезdnиков на севере распространения сосновых лесов // Рус. орнитол. журн. 2007. Т. 16, № 353. С. 471–485.
2. Balen J. H., Booy C. J. H., Franeker J. A., Osieck E. R. Studies on hole-nesting birds in natural nest sites // Ardea. 1982. Vol. 70. P. 1–24.
3. Wesolowski T. Bird community dynamics in a primeval forest – is interspecific competition important? // Ornis Hungarica. 2003. Vol. 12–13. P. 51–62.
4. Чернышов В. М., Ердаков Л. Н. Цикличность многолетней динамики репродуктивных параметров полевого воробья *Passer montanus* // Принципы экологии. 2017. № 2 (23). С. 83–93.
5. Куранов Б. Д. Гнездовая биология урбанизированных популяций птиц-дуплогнезdnиков // Сиб. экол. журн. 2009. Т. 16, № 3. С. 429–438.
6. Дорошин Р. Е. Зависимость сроков и успешности размножения скворцов от динамических характеристик климата // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер. Биология и экология. 2008. № 10. С. 102–109.
7. Versluijs M., Turnhout C. A. M. van, Kleijn D., der Jeugd H. P. van. Demographic changes underpinning the population decline of Starlings *Sturnus vulgaris* in The Netherlands // Ardea. 2016. Vol. 104. P. 153–165.
8. Field R. H., Anderson Guy Q. A. Habitat use by breeding Tree Sparrows *Passer montanus* // Ibis. 2004. Vol. 146, № 2. P. 60–68.
9. Pinowski J., Pinowska B., Barkowska M., Jerzak L., Zduniak P., Tryjanowski P. Significance of the breeding season for autumnal nest-site selection by Tree Sparrows *Passer montanus* // Acta Ornithol. 2006. Vol. 41. P. 83–87.
10. Иваницкий В. В., Матюхин А. В. К популяционной биологии полевых воробьев (*Passer montanus*) в городских лесопарках // Зоол. журн. 1990. Т. 69, № 4. С. 78–89.
11. Птицы севера Нижнего Поволжья : в 5 кн. Кн. V. Состав орнитофауны / Е. В. Завьялов, Е. Ю. Мосолова, В. Г. Табачишин [и др.]. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2011. 360 с.
12. Учебно-краеведческий атлас Саратовской области / В. В. Аникин, Е. В. Акифьева, А. Н. Афанасьева [и др.]; гл. ред. А. Н. Чумаченко, отв. ред. В. З. Макаров. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2013. 144 с.
13. Мельников Е. Ю. Дятлообразные (Piciformes) пригородных и урбанизированных экосистем : пространственное распределение, размножение и особенности выбора кормовых объектов : дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2014. 211 с.
14. Гудина А. Н. Методы учета гнездящихся птиц : Картирование территорий. Запорожье : Дикое поле, 1999. 341 с.
15. Методы количественных учётов и морфологических исследований наземных позвоночных животных : учеб.-метод. пособие для полевой практики по зоологии позвоночных животных и самостоятельной научной работы студентов биологического факультета / А. В. Беляченко, Г. В. Шляхтин, А. О. Филиппович [и др.]. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2014. 148 с.
16. Харитонов С. П., Иваненко Н. Ю., Чухарева И. П. Использование GPS-навигатора для картирования колоний птиц: методическая проверка // Поволж. экол. журн. 2011. № 1. С. 59–69.
17. Алексеев В. А. Диагностика жизненного состояния деревьев и древостоев // Лесоведение. 1989. № 4. С. 51–57.
18. Харитонов С. П. Изучение пространственного распределения гнезд в колонии. Материалы и теоретические аспекты исследования морских птиц : материалы V Всерос. школы по морской биологии. Ростов н/Д : Изд-во ЮНЦ РАН, 2007. С. 83–104.
19. Харитонов С. П., Эббинге Б. С., Фой Д. де. Колонии черных казарок возле белых сов: зависимость расстояния между гнездами от плотности размножающихся песцов // Изв. РАН. Сер.биол. 2013. № 1. С. 53–59.
20. Clark P. J., Evans F. C. Distance to the nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations // Ecology. 1954. Vol. 35, № 4. P. 445–453.
21. Кобзарь А. И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2006. 816 с.
22. Гавриленко В. С., Мельников Е. Ю. Особенности населения птиц-дуплогнезdnиков в зеленой зоне г. Энгельса // Изучение, сохранение и восстановление естественных ландшафтов : сб. ст. VI Всерос. с междунар. участием науч.-практ. конф. М. : Планета, 2016. С. 155–162.



23. Мельников Е. Ю., Беляченко А. В., Беляченко А. А. Особенности пространственного распределения гнездовых участков пестрого дятла (*Dendrocopos major*) в пригородном лесопарке г. Саратова // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология, 2014. Т. 14, вып. 3. С. 105–109.
24. Wesolowski T. «Lifespan» of woodpecker-made holes in a primeval temperate forest : A thirty year study // Forest Ecology and Management. 2011. Vol. 262. P. 1846–1852.
25. Харитонов С. П. Пространственно-этологическая структура колоний околородных птиц // Зоол. журн. 2011. Т. 90, № 7. С. 846–860.
26. Фетисов С. А., Гагинская А. Р. Полевой воробей. Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1981. 304 с.
27. Рыжановский В. Н. Домовый (*Passer domesticus*) и полевой (*Passer montanus*) воробьи (Passeriformes, Passeridae) в Нижнем Приобье и на полуострове Ямал – особенности освоения севера Западной Сибири // Зоол. журн. 2016. Т. 95, № 10. С. 1218–1224.
28. Smith K. W. The implications of nest site competition from starlings *Sturnus vulgaris* and the effects of spring temperatures on the timing and breeding performance of great spotted woodpeckers *Dendrocopos major* in southern England // Ann. Zool. Fennici. 2006. Vol. 43. P. 177–185.

Structure of Colonies and Nesting Peculiarities of Common Starling (*Sturnus vulgaris*) and Tree Sparrow (*Passer montanus*) in Green Zone of Engels City

E. Yu. Melnikov, V. S. Gavrilenko

Evgeniy Yu. Melnikov, <https://orcid.org/0000-0003-3597-6321>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, skylark88@yandex.ru

Victoria S. Gavrilenko, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, udc-4@yandex.ru

We researched the nesting habits of the common starling and the tree sparrow in a woodland of Engels city altered by humans, the Saratov region. Birds' selectivity in the choice of nesting holes was found. The way birds use nesting trees in different vital condition was researched. The estimation of spatial distribution of nests was made by the method called "the nearest neighbor". We calculated the Clark–Evans criterion for the distribution of nests of each species as well as for the total distribution of nests, calculated the distance of random distribution and the average minimum distance between nest holes. Specific features of the way birds use urban green areas were identified. During the nesting season the biotopes of the studied plot are evenly saturated with nests of both types. The tree sparrow shows greater selectivity, than the common starling and prefers weak nest trees and small holes of natural origin. Both species of birds have stable large density in woodland because of different selectivity and different strategies of using woodland biotopes.

Key words: common starling, tree sparrow, nest hole, spatial distribution, nearest neighbor method.

Образец для цитирования:

Мельников Е. Ю., Гавриленко В. С. Пространственная структура колонии и особенности гнездования обыкновенного скворца (*Sturnus vulgaris*) и полевого воробья (*Passer montanus*) в зеленой зоне г. Энгельса // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 480–486. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-480-486>

Cite this article as:

Melnikov E. Yu., Gavrilenko V. S. Structure of Colonies and Nesting Peculiarities of Common Starling (*Sturnus vulgaris*) and Tree Sparrow (*Passer montanus*) in Green Zone of Engels City. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 480–486 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-480-486>